



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA



“EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE Al_2O_3 EN DOS MODELOS IN VIVO”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA

PRESENTA:

ING. ERANDY GADIELA GALLEGOS MARTÍNEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. MAYRA ANGÉLICA ALVAREZ LEMUS

EN CODIRECCIÓN:

DRA. SUSANA DEL CARMEN DE LA ROSA GARCÍA



DIRECCIÓN

CUNDUACÁN, TABASCO.

FEBRERO DE 2025

Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Cunduacán Tabasco, del mes enero del año 2025, el que suscribe Erandy Gadiela Gallegos Martínez alumna del Programa de Ciencias en Ingeniería con número de matrícula 222D19004, adscrito a la División Académica de Ingeniería y Arquitectura, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autora de la Tesis presentada para la obtención del grado de maestría y titulada Evaluación Ecotoxicológica de Nanopartículas del Al_2O_3 en dos modelos *in vivo* dirigida por la Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus y Dra. Susana del Carmen de la Rosa García.

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente

Villahermosa, Tabasco a 15 de enero 2025.



Erandy Gadiela Gallegos Martínez



JEFATURA DE POSGRADO

Cunduacán, Tabasco a 14 de enero de 2025.

MEM / AP-DAIA / 01 / 2025

PARA **DRA. DORA MARÍA FRÍAS MÁRQUEZ**
DIRECTORA DE LA DAIA
DE: COMISIÓN SINODAL
ASUNTO: APROBACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

Una vez hecha la revisión detallada de la Tesis denominada:

“Evaluación Ecotoxicológica de Nanopartículas de Al₂O₃ en dos Modelos *In vivo*”

Desarrollado por la Ing. **Erandy Gadiela Gallegos Martínez**, de la **Maestría en Ciencias en Ingeniería**, le comunicamos que aceptamos la impresión del trabajo, ya que el mismo ha cumplido con los requisitos necesarios.

COMITÉ SINODAL


DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ RIVERA
PRESIDENTE


DRA. DORA MARÍA FRÍAS MÁRQUEZ
SECRETARIO


DRA. MAYRA ANGÉLICA ÁLVAREZ LEMUS
VOCAL 1


DR. ROSENDO LÓPEZ GONZÁLEZ
VOCAL 2


DRA. SUSANA DEL CARMEN DE LA ROSA
GARCÍA
VOCAL 3



UJAT

UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura



2025
ASO de la
Mujer
Indígena

DIRECCIÓN

OFICIO: DAIA/DIR/149/2025
FECHA: 16 de enero de 2025
ASUNTO: Autorización de
impresión definitiva

ING. ERANDY GADIELA GALLEGOS MARTÍNEZ
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
PRESENTE

En virtud de haber elaborado su trabajo de Tesis denominado:

“Evaluación Ecotoxicológica de Nanopartículas de Al₂O₃ en dos Modelos *In vivo*”

Para obtener el grado de **Maestra en Ciencias en Ingeniería** y en la cual ha tenido como Directora de Tesis a la Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus.

Tengo a bien autorizarle la **IMPRESIÓN DEFINITIVA** de dicho trabajo, continuando con los trámites correspondientes para su examen de obtención de grado.

Sin otro particular, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

DRA. DORA MARÍA FRÍAS MÁRQUEZ
DIRECTORA

c.c.p. Archivo
DRA'DMFM / MCA'RACT



DIRECCIÓN

Carta de Cesión de Derechos

Cunduacán, Tabasco a 15 de enero de 2025

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTOR(A) y/o AUTORES(RAS) en la producción, creación y/o realización de la obra denominada "Evaluación Ecotoxicológica de Nanopartículas de Al₂O₃ en dos modelos *in vivo*".

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance de la tesis en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un periodo de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES



Ing. Erandy Gadiela Gallegos Martinez



Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus



Dra. Susana del Carmen de la Rosa Garcia

TESTIGOS



Dra. Ruth Lezama García



Dr. Resendo Lopez González

La ciencia siempre vale la pena, porque sus descubrimientos
tarde o temprano, siempre se aplican.

Severo Ochoa

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada, estoy profundamente agradecida por la oportunidad de haber podido llevar a cabo un proyecto de investigación.

A la División Académica de Ingeniería y Arquitectura y a la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco., por brindarme las herramientas necesarias en diversas actividades que fueron fundamentales para la culminación exitosa de este proyecto de investigación.

A mi directora de tesis Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus, quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su asesoramiento, orientación y paciencia durante este proceso. Su apoyo y dedicación han sido fundamentales para la culminación de esta tesis.

A mi codirectora de tesis Dra. Susana del Carmen de la Rosa García por su paciencia, su gran apoyo, asesoramiento y sus conocimientos en la revisión de esta tesis. A ambas les estoy profundamente agradecida por su guía experta, este logro no habría sido posible sin su invaluable ayuda.

Al comité revisor de este proyecto el Dr. Miguel Ángel Hernández Rivera, Dra. Dora María Frías Márquez y Dr. Rosendo López González. Su valioso apoyo, tiempo en la revisión, comentarios y sugerencias fueron fundamentales para la mejora de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de nanotecnología y biológicas por sus aportes y apoyo durante este tiempo juntos y a mis compañeros que juntos iniciamos este camino Fernanda, Hedilberto y Nancy gracias por hacer de este camino más ameno. Siempre los llevare en mi corazón.

DEDICATORIAS

A ti Dios, que ha sido mi luz en momentos de oscuridad y mi paz en medio de la tormenta. En esta trayectoria académica, reconozco tu presencia y tu guía inquebrantable. Te dedico estas palabras como expresión de mi gratitud y humildad, este logro no sería posible sin ti.

A mi querido esposo que, a lo largo de este arduo camino, tu apoyo incondicional ha sido mi mayor fortaleza, gracias por estar a mi lado en cada paso, por tu amor, paciencia, comprensión. Esta tesis no solo lleva mi nombre, sino también el tuyo. A ti, mi compañero de vida dedico este logro, garou y charanko, gracias por ser mi motivación y por ser el pilar en el que me sustentó, los amo.

A mi querida tía Saraí, por ser un apoyo incondicional, tus palabras de aliento y tu amor han sido pilares fundamentales en mi camino, gracias por creer en mí, por inspirarme con tu ejemplo de dedicación y por estar presente en cada etapa de este proceso.

A mis papás, los pilares fundamentales en mi vida gracias por su apoyo y ejemplo de esfuerzo, les agradezco por haberme brindado las herramientas necesarias para crecer, aprender y esforzarme en la vida.

A mis hermosas hermanas, mis compañeras en aventuras, confidencias y risas, gracias por su amor incondicional, por estar siempre a mi lado y por ser mi fuente de complicidad y alegría, que juntas sigamos compartiendo momentos inolvidables y sigamos fortaleciendo nuestro vínculo de hermanas, las amo.

A mi querida familia y amigos, por su inquebrantable apoyo y amor a lo largo de este camino. Gracias por celebrar conmigo cada logro, los llevo siempre en mi corazón y los amo.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
PALABRAS CLAVES	5
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	
1.1. Introducción	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1. Óxido de aluminio.....	8
2.2. Propiedades del óxido de aluminio	8
2.3. Fases cristalinas del óxido de aluminio.....	9
2.4. Aplicaciones del óxido de aluminio	10
2.5. Métodos de obtención del óxido de aluminio	11
2.6. Generalidades de la <i>Eisenia foetida</i>	13
2.7. Generalidades de la <i>Artemia Salina</i>	15
2.8. Antecedentes.....	17
CAPÍTULO III: JUSTIFICACIÓN, PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
3.1. Justificación.....	23
3.2. Pregunta de investigación.....	24
3.3. Hipótesis.....	24
3.4. Objetivos.....	25
3.4.1. Objetivo general.....	25
3.4.2. Objetivos específicos.....	25
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA	
4.1. Reactivos.....	27
4.2. Síntesis de nanopartículas de Al_2O_3 por el método sol-gel modificado por Yoldas.....	27
4.3. Técnicas de caracterización de las nanopartículas de Al_2O_3 sintetizadas	28
4.4. Preparación de las nanopartículas de Al_2O_3 para las pruebas <i>in vivo</i> ...	29
4.5. Evaluación en modelos biológicos	29
4.6. Ensayo de ecotoxicidad aguda en nauplios de <i>Artemia salina</i>	29



4.6.1. Obtención de los nauplios de <i>Artemia salina</i>	29
4.6.2. Ensayo de toxicidad aguda.....	30
4.6.3. Análisis de daño celular en nauplios de <i>Artemia salina</i>	30
4.6.4. Análisis de la concentración letal media (CL ₅₀).....	30
4.7. Ensayo de ecotoxicidad aguda en <i>Eisenia foetida</i>	31
4.7.1. Obtención de la lombriz <i>Eisenia foetida</i>	31
4.7.2. Ensayo de ecotoxicidad aguda.....	31
4.7.3. Parámetros evaluados en las lombrices <i>Eisenia foetida</i>	32
4.8. Análisis de resultados.....	32
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	34
5.2. Difracción de rayos X (DRX) de polvos.....	37
5.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	41
5.4. Fisisorción de nitrógeno	45
5.5. Dispersión de luz dinámica (DLS).....	50
5.6. Dispersión de luz electroforética (ELS)	53
5.7. Ensayos de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	55
5.8. Ensayos de toxicidad en <i>Eisenia foetida</i>	62
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
6.1. Conclusiones	69
6.2. Recomendaciones.....	71
CAPÍTULO VII: REFERENCIAS CITADAS	
7.1. Referencias citadas.....	73
ANEXOS	
8.1. Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	87



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Etapas del proceso sol-gel para la obtención de NP de Al_2O_3	12
Figura 2.- Partes de la lombriz <i>Eisenia foetida</i>	14
Figura 3.- Partes de la <i>Artemia salina</i> en fase nauplio	16
Figura 4.- Procedimiento empleado para la síntesis de NP de Al_2O_3	28
Figura 5.- Micrografías SEM de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua. a) y d) Al1:1.5, b) y e) Al1:2.5 y c) y f) Al1:3.5 a 25,000x (a-c) y 100,000x (d-f)	35
Figura 6.- Difractogramas DRX de las NP de Al_2O_3 calcinados a 600° C, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5.....	38
Figura 7.- Espectros FTIR de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5. las muestras fueron mezcladas con KBr	41
Figura 8.- Región de 1300 a 400 cm^{-1} de los espectros FTIR de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5. las muestras fueron mezcladas con Kbr	43
Figura 9.- Isotermas de adsorción-desorción de N_2 de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5	45
Figura 10.- Distribución de tamaño de poros de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5.....	48
Figura 11.- Tamaño hidrodinámico de Al_2O_3 con distintas relaciones molares, alcóxido:agua 1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5. Las mediciones se realizaron empleando agua como dispersante a temperatura ambiente	50
Figura 12.- Observación de nauplios de <i>Artemia salina</i> bajo un microscopio óptico, tras 48 h de exposición a nanopartículas de Al_2O_3 , obtenidas con	



distintas relaciones molares de alcóxido:agua 1:1.5 (a-e), 1:2.5 (f-j) y 1:3.5 (k-o), a concentraciones de 125 mg/L a 25 mg/L. Se incluyeron el control negativo (p) y el control positivo utilizando $K_2Cr_2O_7$ a concentraciones de 60 mg/L a 15 mg/L56

Figura 13.- Porcentaje de mortalidad en nauplios de *Artemia salina* tras 48 h de exposición a nanopartículas de Al_2O_3 , obtenidas con distintas relaciones molares de alcóxido:agua 1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5.....57

Figura 14.- Porcentaje de mortalidad en nauplios de *A. salina* tras 48 h de exposición con $K_2Cr_2O_7$ a concentraciones de 15, 30 y 60 mg/L.....58

Figura 15.- Nauplios de *Artemia salina* observados en el microscopio óptico de epifluorescencia tras 48 h de exposición a 125 mg/L de nanopartículas de Al_2O_3 , obtenidas con distintas relaciones molares alcóxido:agua y teñidas con naranja de acridina. (a) Control negativo, (b) 1:1.5, (c) 1:2.5, (d) 1:3.5 y control positivo con $K_2Cr_2O_7$ a diferentes concentraciones (e) 15 mg/L, (f) 30 mg/L y (g) 60 mg/L.....60

Figura 16.- Lombrices californianas sometidas a distintas síntesis de nanopartículas de Al_2O_3 , obtenidas con distintas relaciones molares de alcóxido:agua 1:1.5 (b), 1:2.5 (c) y 1:3.5 (d), expuestas por 14 días de exposición a concentraciones de 1000 mg/kg. Se incluyeron el control negativo (a y e) y el control positivo utilizando $ClCH_2CONH_2$ a concentraciones de 14.4 (f), 28.8 (g) y 57.7 mg/kg (h) 64

Figura 17.- Porcentaje de mortalidad en *Eisenia foetida* tras 14 días de exposición con ($ClCH_2CONH_2$) a concentraciones de 14, 28 y 57 mg/kg65

Figura 18.- Pérdida de peso en *Eisenia foetida* tras 14 días de exposición a nanopartículas de Al_2O_3 , obtenidas con distintas relaciones molares de alcóxido:agua 1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5 *Letras iguales no hay diferencias significativas entre las concentraciones de cada tratamiento.....66



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Tamaño de cristalito de las muestras, calculado a través de la ecuación de Scherrer, para las reflexiones de los planos 400 y 440.....	40
Tabla 2.- Valores de fisisorción de N_2 de las nanopartículas de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5. Los parámetros texturales fueron obtenidos a partir de las curvas de desorción y adsorción de N_2 a 77 k.....	47
Tabla 3.- Valores de DLS y ELS de óxido de aluminio Al_2O_3 con distintas relaciones molares, alcóxido:agua (1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5). Las mediciones se realizaron empleando agua y solución salina al 3.5 % como dispersante a temperatura ambiente	53
Tabla 4.- Concentración letal media (CL_{50}) de NP de óxido de aluminio Al_2O_3 con distintas relaciones molares, y $K_2Cr_2O_7$, en <i>Artemia salina</i>	58



RESUMEN

En este trabajo se sintetizaron NP de alúmina controlando su morfología y propiedades mediante, utilizando diferentes relaciones molares de alcóxido:agua (1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5) y glicerol como aditivo para optimizar sus propiedades y evaluar su efecto en la toxicidad de las NP. Se empleó tri-sec-butóxido de aluminio como precursor del metal y HNO_3 como catalizador de síntesis. Los polvos secos se calcinaron a $600\text{ }^\circ\text{C}$, $2^\circ\text{C}/\text{min}$ durante 2 h y se caracterizaron con diferentes técnicas: infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (XRD), dispersión de luz electroforética (ELS), dispersión de luz dinámica (DLS), fisisorción de nitrógeno y microscopía electrónica de barrido (SEM). Los ensayos de toxicidad aguda se llevaron a cabo con los modelos biológicos *Artemia salina* y *Eisenia foetida* para evaluar la ecotoxicidad de las NP.

Los tres nanomateriales (1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5) presentaron la fase cristalina gamma-alúmina, y los tamaños de cristalito calculados con la ecuación de Scherrer fueron de 57, 59 y 56 nm, mientras que el tamaño hidrodinámico en agua fue de 515, 1743 y 145 nm, respectivamente. El potencial zeta a pH 7, fue de +12.9 mV y + 9.24 mV para la síntesis 1:1.5 y 1:2.5 y -5.27 mV para la síntesis con la mayor proporción de agua (1:3.5). La modificación de las relaciones molares tuvo un efecto en las propiedades texturales del material y la mesoporosidad de la superficie. Los valores del área superficial específica, determinada mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (BET), fueron 266, 218 y 222 m^2/g para las distintas muestras, mientras los tamaños promedio de poro oscilaron entre 5.6 y 7.9 nm.

Para evaluar la toxicidad, se expusieron nauplios de *Artemia salina* durante 48 h a diferentes concentraciones de nanopartículas (125, 100, 75, 50 y 25 mg/L), junto con su respectivo control y dicromato de potasio como tóxico de referencia. La exposición a las diferentes nanopartículas mostró una baja toxicidad, con valores de CL_{50} muy cercanos entre sí de 185.85, 144.95 y 174.65 mg/L para las relaciones molares 1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5, respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas entre ellas ($p > 0.05$), pero con diferencias significativas respecto al $K_2Cr_2O_7$, con un CL_{50} de 9.9 mg/L. Este bajo nivel de toxicidad fue



confirmado mediante el marcador fluorescente naranja de acridina, donde se observó una fluorescencia verde opaca en los nauplios expuestos indicando el bajo daño celular. En contraste, los nauplios expuestos al $K_2Cr_2O_7$ mostraron una fluorescencia verde intensa, lo que confirma los severos daños celulares, probablemente causados por necrosis o apoptosis avanzada, lo que explica el alto número de nauplios muertos. Los ensayos con el modelo de *Eisenia foetida*, también confirma la baja toxicidad de las NP, ya que no se registraron muertes durante los 14 días de exposición a las diferentes concentraciones de las NP con respecto al tóxico cloroacetamida. El análisis de la pérdida de peso de las lombrices reveló que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$), entre la síntesis y las concentraciones, siendo la síntesis con mayor relación molar de agua 1:3.5 la que muestra un menor efecto en la pérdida de peso de las lombrices, lo que sugiere que las propiedades fisicoquímicas, específicamente la superficie específica, el volumen de poro, y el potencial zeta negativo, están directamente relacionadas con la baja toxicidad observada en *Eisenia foetida*.



ABSTRACT

In this work, alumina NPs were synthesized, controlling their morphology and properties, using different molar ratios of alkoxide:water (1:1.5, 1:2.5 and 1:3.5) and glycerol as an additive to optimize their properties and evaluate their effect on the toxicity of NPs. Aluminum tri-secbutoxide was used as a metal precursor and HNO_3 as a synthesis catalyst. The dried powders were calcined at $600\text{ }^\circ\text{C}$, $2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ for 2 h and characterized with different techniques: Fourier transform infrared (FTIR), X-ray diffraction (XRD), electrophoretic light scattering (ELS), dispersion dynamic light analysis (DLS), nitrogen physisorption and scanning electron microscopy (SEM).

The three nanomaterials (1:1.5, 1:2.5 and 1:3.5) presented the gamma-alumina crystalline phase, and the crystallite sizes calculated with the Scherrer equation were 57, 59 and 56 nm, while the hydrodynamic size in water was 515, 1743 and 145 nm, respectively. The zeta potential at pH 7 was +12.9 mV and + 9.24 mV for the 1:1.5 and 1:2.5 synthesis and -5.27 mV for synthesis with the highest proportion of water (1:3.5). The modification of the molar ratios influenced the textural properties of the material and the mesoporosity of the surface. The values of the specific surface area, determined by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method, were 266, 218 and 222 m^2/g for the different samples, while the average pore sizes ranged between 5.6 and 7.9 nm.

To evaluate the toxic effects, *Artemia salina* nauplii were exposed for 48 h to different concentrations of NP (125, 100, 75, 50, and 25 mg/L), along with their respective control and potassium dichromate as a reference toxicant. The exposure to the different nanoparticles showed low toxicity, with CL_{50} values very close to each other: 185.85, 144.95, and 174.65 mg/L for the molar ratios 1:1.5, 1:2.5, and 1:3.5, respectively, with no statistically significant differences between them ($p > 0.05$), but with significant differences compared to $K_2Cr_2O_7$, which presented an CL_{50} of 9.9 mg/L. This low level of toxicity was confirmed using the fluorescent marker acridine orange, where a green fluorescence was observed in the nauplii exposed, indicating low cellular damage. In contrast, nauplii exposed to $K_2Cr_2O_7$ showed green fluorescence, confirming severe cellular damage, probably caused by necrosis or advanced apoptosis, explaining the high



mortality rate of the nauplii. The assays with the *Eisenia foetida* also confirmed the low toxicity of the NP, as no mortality was recorded during the 14-day exposure to different nanoparticle concentrations compared to the toxicant ethylenediamine. The analysis of weight loss in the worms revealed significant differences ($p \leq 0.05$) between the synthesis and concentrations, with the synthesis with the highest water molar ratio (1:3.5) showing the least effect on weight loss. This suggests that the physicochemical properties, specifically the surface area, pore volume, and negative zeta potential, are directly related to the low toxicity observed in *Eisenia foetida*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



LISTA DE ABREVIATURAS

Al_2O_3 : Óxido de aluminio

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

Np: Nanopartículas

Nm: Nanómetros

Cm: Centímetros

PVA: poli (acetato de vinilo)

pH: Potencial de hidrógeno

rpm: Revoluciones por minuto

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

DRX: Difracción de rayos X

FTIR: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

SEM: Microscopía electrónica de barrido

DLS: Dispersión de luz dinámica

ELS: Dispersión de luz electroforética

ζ : Potencial zeta



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN



1.1 Introducción

En los últimos años, la nanotecnología ha despertado gran interés en la comunidad científica (Harinisri et al., 2023), con un aumento significativo en la producción de nanomateriales, un impacto en la industrialización y su comercialización en todo el mundo. Como resultado, la población ha podido acceder a una mayor de ellas, lo que ha contribuido a mejorar su bienestar a corto plazo y a bajo costo (Hu et al., 2010). Las nanopartículas (NP), son consideradas como un elemento clave para el desarrollo de productos industriales de nueva generación (Ogolo y Onyekonwu, 2021). Los nanomateriales se fabrican en rango de tamaño que va desde 1 a 100 nanómetros (nm), una escala que corresponde a la millonésima parte de un milímetro (Nel et al., 2006).

Los nanomateriales se obtienen por diversos métodos de síntesis, como la precipitación, la síntesis hidrotérmica y el proceso sol-gel. Estas técnicas permiten ajustar las propiedades físicas y químicas de las NP, confiriéndoles un gran potencial para su aplicación en diversos sectores: industriales, biomédicos, incluso en productos de uso diario (Feng y Johnson, 2013). Entre los nanomateriales que destacan, el óxido de aluminio, también conocido como alúmina, es de los nanomateriales más versátiles y ampliamente utilizados debido a sus excepcionales propiedades como su estabilidad térmica y alta dureza, cualidades que le permiten una gran variedad de aplicaciones, como en la industria cerámica, el soporte de catalizadores, fabricación de dispositivos láser y en el tratamiento de aguas residuales (Jalili et al., 2022; Milani et al., 2020).

Sin embargo, algunos estudios han documentado los posibles riesgos ambientales y a la salud humana que pueden representar estas NP de alúmina (Doskocz et al., 2017; Nogueira et al., 2020), y su afecto negativo en los ecosistemas y organismos existentes (Chahardoli et al., 2020; Zhang et al., 2021). Por otra parte, se ha reportado que las NP de óxido de aluminio no dañan al ecosistema; no obstante, se debe ser cuidadoso al considerar el tipo de



nanomaterial, sus características superficiales, pH, salinidad, ya que estos pueden influir en su impacto ambiental. Es por ello, el énfasis de seguir realizando pruebas para evaluar el posible nivel de toxicidad en sus diversas aplicaciones, a fin de asegurar la bioseguridad (Zheng et al., 2019).

Al respecto, algunos estudios han señalado la importancia de realizar pruebas de ecotoxicidad estandarizadas, especialmente debido a la magnitud de las actividades relacionadas con las NP de alúmina. Organismos como la lombriz californiana, *Eisenia foetida*, han sido propuestos como modelos confiables para evaluar la toxicidad de estos materiales, siendo su uso altamente recomendado por la ISO 17512-1:2008 (International Organization for Standardization [ISO], 2008).

La especie *Eisenia foetida*, conocida como lombriz californiana, es ampliamente utilizada en estudios de ecotoxicología y toxicología debido a su capacidad de tolerancia a diversas temperaturas y humedad. Además, estas lombrices son más susceptibles a contaminantes metálicos en el suelo en comparación con otros organismos (Neuhauser et al., 1985; Wang et al., 2012). Otro organismo recomendado por la ISO/TS 20787:2017 (ISO, 2017) como modelo confiable para evaluar la toxicidad de los nanomateriales es la *Artemia salina*, conocida como camarón de salmuera, que se distingue por su facilidad de cultivo, tamaño y adaptabilidad en condiciones adversas (Lewan et al., 1992). Su alta capacidad para absorber contaminantes en aguas salinas lo convierte en uno de los invertebrados más utilizados para evaluar la toxicidad de las NP (Bhuvaneshwari et al., 2018).

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la ecotoxicidad con diferentes NP de óxido de aluminio, en las cuales se utilizó una variación de agua con el método de la síntesis. El objetivo de esta modificación fue reducir la toxicidad de las NP de alúmina en los modelos biológicos propuestos, que incluyen las especies *Eisenia foetida* y *Artemia salina*.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Capítulo II

MARCO TEÓRICO

2.1. Óxido de aluminio

El óxido de aluminio es un material inorgánico que está compuesto por dos átomos de aluminio y tres átomos de oxígeno. Su fórmula química es Al_2O_3 y es un material cerámico excepcionalmente utilizado por sus propiedades físicas (resistencia eléctrica y resistencia a la corrosión) y químicas (dureza y resistencias ante altas temperaturas) (Hassanpour et al., 2018; Grande et al., 2023). Estas propiedades permiten que la alúmina tenga diversas aplicaciones como aditivo en alimentos, sustancias dentales, productos de higiene, y en los tratamientos de aguas residuales oleosas (Ejileugha et al., 2022).

2.2. Propiedades del óxido de aluminio

Las NP de alúmina (Al_2O_3) mejoran la dureza y la resistencia al desgaste de los compuestos a los que se añaden. Al incorporar NP de TiO_2 y CuO en una matriz de aluminio, se logra un nanocompuesto con superiores propiedades mecánicas. Este muestra un notable aumento en microdureza y resistencia, y con él se reduce la tasa de desgaste. Dicho cambio en los mecanismos de desgaste, abrasión y adhesión se atribuye a la presencia de estas NP (Ahmadi y Siadati, 2018).

La estabilidad térmica de los compuestos reforzados con NP de óxido de aluminio es notablemente alta. Al fabricar recubrimientos de nanocompuestos Al_2O_3/Si_3N_4 sobre una aleación de aluminio mediante oxidación electroquímica por plasma, se logran aumentos significativos en la dureza, pasando de 380 ± 50 HV a 712 ± 36 HV (*hardness vickers*). Estos recubrimientos no solo muestran una mejora en la dureza, sino que también ofrecen una resistencia superior en comparación con los recubrimientos anodizados convencionales (Mohammadi et al., 2016).

Por otra parte, los nanomateriales de alúmina son reconocidos por sus excelentes propiedades como aislantes eléctricos. Las propiedades eléctricas de las películas delgadas de óxido de aluminio amorfo demostraron que el Al_2O_3 , con un ancho de banda de 9.9 eV, es un material prometedor. Además, esta investigación sugiere que las películas de alúmina preparadas mediante

deposición láser pulsada podrían servir como materiales de alta constante dieléctrica, resaltando el potencial de los nanomateriales de alúmina como aislantes eléctricos de alto rendimiento para aplicaciones en la próxima generación de dispositivos electrónicos (Katiyar et al., 2005).

La biocompatibilidad de los nanomateriales de Al_2O_3 también es de particular interés en aplicaciones biomédicas, pues las NP de alúmina pueden mejorar la resistencia del adhesivo de alcohol polivinílico (PVA) en condiciones húmedas y a altas temperaturas. Ante esto, los investigadores reportaron que la inclusión de NP en el PVA mejoraba significativamente la resistencia al cizallamiento de las juntas de madera en todas las condiciones, indicando que el óxido de aluminio podría tener aplicaciones prometedoras en el campo biomédico debido a su capacidad para mejorar las propiedades mecánicas de los compuestos en los que se incorpora (Kaboorani y Riedl, 2012).

Sin embargo, en el ámbito de la catálisis y la adsorción, las NP de óxido de aluminio han demostrado ser altamente efectivas. En un estudio se exploraron las propiedades aislantes de nanofluidos de nitruro de aluminio en aceite de transformador, demostrando que estas NP mejoraban significativamente las propiedades aislantes y térmicas, lo cual es crucial para su aplicación en sistemas de energía y dispositivos eléctricos. Este enfoque de nanofluidos abre nuevas vías para el desarrollo de materiales con un mejor desempeño catalítico y de adsorción (Liu et al., 2016).

2.3. Fases cristalinas del óxido de aluminio

La alúmina (Al_2O_3) puede presentar diversas fases cristalinas, cada una con estructuras y propiedades específicas (Nogueira et al., 2020; Sofronov et al., 2022). Dichas etapas se describen en los siguientes párrafos:

- Fase $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$: es la más estable y densa, con estructura hexagonal compacta. Se utiliza en aplicaciones que requieren alta resistencia al desgaste y estabilidad térmica.

- Fase $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$: tiene una estructura cúbica y es menos densa que la $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$. Es conocida por su alta área superficial y actividad catalítica, lo que la hace útil en catálisis y como soporte catalítico.
- Fases θ , δ , y $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$: son fases de transición que se pueden formar durante el proceso de calcinación antes de alcanzar la fase α . Tienen aplicaciones específicas en función de su estructura y propiedades.

2.4. Aplicaciones del óxido de aluminio

Las NP de óxido de aluminio juegan un papel crucial en la mejora de la eficiencia de las células solares de arseniuro de galio (GaAs) al ser decoradas con NP de plata controladas por tamaño, fabricadas mediante deposición enmascarada a través de plantillas de óxido de aluminio anódico. La fuerte dispersión por los plasmones de superficie interactuantes en NP de alta relación de aspecto aumenta efectivamente la trayectoria óptica de la luz incidente en las capas absorbentes, lo que resulta en un incremento del 8 % en la densidad de corriente de cortocircuito de la célula. Esta funcionalidad dual de las NP plasmónicas permite capas fotovoltaicas más delgadas en las células solares (Nakayama et al., 2008).

Por otro lado, el uso de NP de óxido de aluminio en recubrimientos protectores ha demostrado ser efectivo en la protección contra la oxidación y el desgaste. Por ejemplo, la generación de NP de aluminio mediante ablación de aluminio en líquidos con pulsos láser cortos ha producido NP altamente estables, las cuales muestran una coloración amarilla y un aumento de la absorción óptica entre 300 y 400 nm tras la ablación con pulsos femtosegundos, posiblemente debido a la resonancia plasmónica de Al nanométrico. Estas soluciones coloidales de NP podrían servir como recubrimientos protectores eficaces contra la oxidación y la corrosión (Stratakis et al., 2009).

Asimismo, dichas soluciones coloidales se han utilizado como soportes catalíticos para mejorar la eficiencia de los procesos catalíticos. Por ejemplo, el autoensamblaje ultrarrápido y la estabilización de NP reactivas en películas de óxido de grafeno reducido demuestran cómo las NP de aluminio pueden ser

incorporadas en matrices conductoras para aplicaciones en almacenamiento de energía electroquímica, catálisis y dispositivos energéticos. Este enfoque de fabricación ultrarrápida se aplica a una amplia gama de materiales, como el aluminio, con lo que se indica su potencial como catalizadores y soportes catalíticos eficientes (Chen et al., 2016).

2.5. Métodos de obtención del óxido de aluminio

En general, la síntesis de NP de óxido de aluminio implica varias técnicas y métodos físicos y químicos. Los métodos químicos, como la precipitación hidrotermal y el sol-gel, son preferidos por su capacidad para controlar la morfología, el tamaño y las propiedades superficiales de las NP. Por ejemplo, la técnica de molienda en condiciones de baja temperatura, conocida como *cryomilling*, se ha utilizado para la síntesis de NP de aluminio y es conocida por la ultrarrefinación del tamaño de la partícula y la supresión de la tasa de oxidación durante la síntesis, lo que es crucial para el aluminio, un metal altamente reactivo y propenso a la oxidación o la nitrificación en la nanoescala (Kumar y Biswas, 2019).

Por otra parte, la síntesis química abarca una gama de métodos sofisticados que ofrecen control preciso sobre las características finales de las NP, incluyendo su tamaño, forma y propiedades superficiales. Estos métodos no solo son fundamentales para la investigación básica, sino que también tienen aplicaciones prácticas en numerosos campos tecnológicos y científicos (Karmaoui et al., 2013). Entre las técnicas destacadas en la síntesis química de NP de óxido de aluminio, la ablación láser en líquidos se presenta como una técnica avanzada que permite la producción controlada de NP. La metodología desarrollada por McClain et al. (2015) demuestra un enfoque efectivo para controlar el tamaño de los nanocristales de aluminio. Para ello se utilizan ajustes en las proporciones del solvente. Este método no solo permite un control riguroso sobre las dimensiones de las NP, sino que también las convierte en un enfoque prometedor para el desarrollo de nanomateriales innovadores y respetuosos para el medioambiente.

Ahora bien, el método sol-gel se destaca por su versatilidad y capacidad para controlar las propiedades de diversos materiales, como el tamaño de la partícula, el área superficial y la morfología. Este proceso involucra la hidrólisis de los precursores, la condensación que forma un gel, el envejecimiento del gel, el secado para obtener un material poroso (xerogel) y el tratamiento térmico a altas temperaturas que promueve la densificación y la cristalización del material, con lo que se obtienen las características finales deseadas (Bokov et al., 2021).

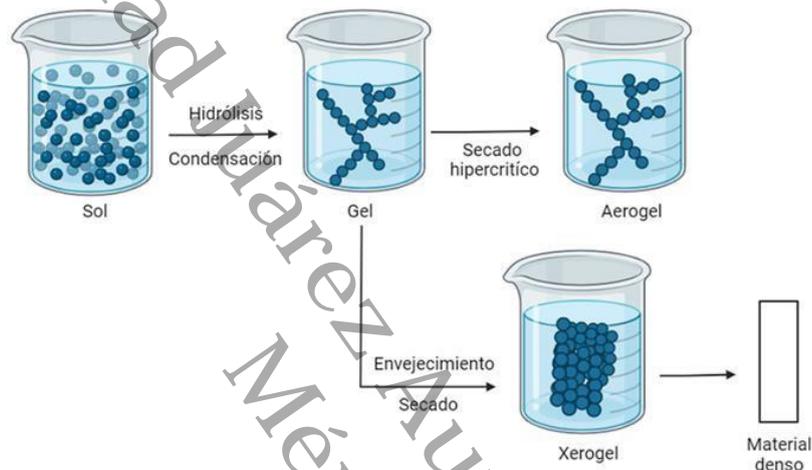


Figura 1.- Etapas del proceso sol-gel para la obtención de NP de Al_2O_3 . Adaptado de *Sol-gel science. The Physics and Chemistry of sol-gel processing*, por Brinker y Scherer, 1990.

En esta investigación se desarrolló una membrana nanocompuesta de poliamida que incorporó NP de alúmina a través del método sol-gel, la cual se dispersó uniformemente dentro de la matriz de poliamida, con lo que se dieron mejoras significativas (Saleh y Gupta, 2012). Así no solo se confirmó la viabilidad de los nanocompuestos de poliamida y alúmina, sino que también se abrieron las puertas a sus aplicaciones en filtración y purificación de agua. Por otro lado, se obtuvieron nanopigmentos de aluminato de cobalto ($CoAl_2O_4$) mediante el sol-gel, demostrando la capacidad de controlar el tamaño de las NP y sus propiedades colorimétricas mediante la temperatura de síntesis. Las NP resultantes mostraron un tamaño promedio entre 2.5 y 6.2 nm y exhibieron las propiedades magnéticas y el color característico del $CoAl_2O_4$ (Karmaoui et al., 2013).

De otra parte, el método de Yoldas (1975) es una variante del método sol-gel diseñado específicamente para la síntesis de óxidos de aluminio. Este se caracteriza por su capacidad para producir óxidos de aluminio de alta pureza y uniformidad en la distribución del tamaño de partícula. Este método es ampliamente reconocido en la literatura científica por su eficacia para producir materiales cerámicos avanzados con aplicaciones en catalizadores, soportes catalíticos y materiales refractarios. Estos métodos innovadores prometen un futuro lleno de posibilidades, donde los materiales nanoestructurados juegan un papel crucial en el avance de diversas aplicaciones. La utilización de estas técnicas de síntesis abre un abanico de posibilidades para el diseño de materiales avanzados con propiedades específicas, adecuadas para una variedad de aplicaciones. Ello no solo amplía la comprensión de los materiales compuestos a nivel nanométrico, sino que también allana el camino para el desarrollo de nuevas tecnologías al marcar el inicio de una era emocionante en el diseño y la aplicación de materiales avanzados.

2.6. Generalidades de la *Eisenia foetida*

La *Eisenia foetida*, también conocida como lombriz californiana (Figura 2), es un tipo de anélido invertebrado compuesto por anillos en todo su cuerpo. Dentro de sus arcos vasculares se encuentran cinco estructuras en forma de bulbo que actúan como corazones, que bombean eficazmente la sangre a través del cuerpo alargado. Su sistema muscular les confiere una gran capacidad de movimiento para desplazarse en todas las direcciones. Aunque carecen de ojos, poseen células a lo largo de su cuerpo que las hacen sensibles a la luz, por lo que evitan su exposición a la luz solar, dado que los rayos ultravioleta pueden matarlas en cuestión de segundos.

La *E. foetida* puede adaptarse a un intervalo de temperatura que va desde los 42 °C; sin embargo, su temperatura óptima es aquella entre los 15 °C y 22 °C. Estos organismos son hermafroditas porque poseen órganos sexuales masculinos y femeninos, aunque necesitan otra lombriz para aparearse y reproducirse. Cuando salen del cocón o capullo son de un color blanco, pero después de seis días se tornan rosadas, y cuando llegan a la etapa de adultez

cambian a un color rojizo oscuro y pueden medir de 6 a 8 cm. Estas lombrices en particular pueden aparearse cada siete días, una vez que poseen el clitelo (etapa adulta), y pueden vivir normalmente hasta cuatro años. Sin embargo, algunos estudios mencionan que dichas lombrices logran vivir hasta 16 años en condiciones adecuadas (Kolesnyk et al., 2018; Hernández et al., 1997; Fuentes, 1987).

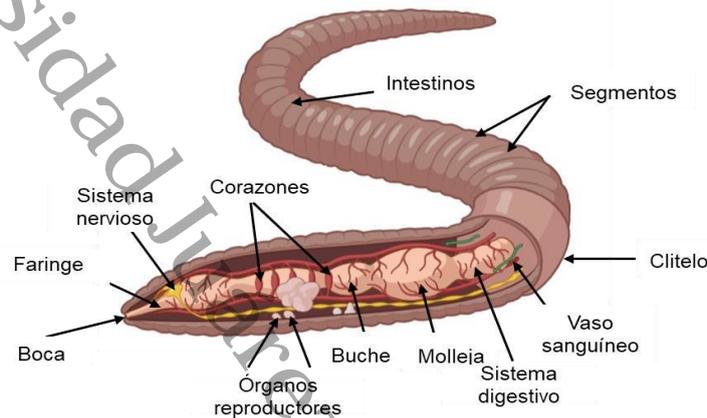


Figura 2.- Partes de la lombriz *Eisenia foetida*. (Ilustración tomadas del software BioRender)

Esta especie es importante en los suelos debido a su capacidad para enriquecer y preservar su textura y estructura. Asimismo, las lombrices proporcionan aeración y los nutrientes necesarios para tener suelos ricos en materia orgánica. En la agricultura, las lombrices son utilizadas en el lombricompostaje para producir humus (abono orgánico), que favorece el enriquecimiento y/o la regeneración de los suelos (Loza et al., 2010).

Igualmente, la ISO 17512-1:2008 (ISO, 2008) ha estandarizado la lombriz californiana como modelo confiable para evaluar la calidad del suelo y el efecto tóxico de diversos contaminantes. Romero et al. (2017) reportaron que las lombrices son más susceptibles a contaminantes metálicos que otros invertebrados del suelo (ácaros, termitas y hormigas), debido a sus características: tamaño, biomasa y comportamiento. Por ende, se han hecho estudios evaluando la toxicidad de diversas NP metálicas, como TiO_2 , ZnO , $AgNO_3$ y F_2O_3 (Samarasinghe et al., 2023; Diez et al., 2015; Lahive et al., 2023; Zhang et al., 2021b).

Adicionalmente, la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 1984) evaluó la toxicidad de nanomateriales en el suelo al utilizar la lombriz californiana, por lo que se propusieron dos pruebas de ensayo de toxicidad aguda: a) la prueba en papel filtro, exponiendo a las lombrices durante 48 a 72 h; y b) la prueba en el suelo artificial, compuesto por turba de musgo de *Sphagnum*. Esta materia orgánica es un nutriente esencial, pues permite simular las condiciones de un suelo natural; además, la arcilla de caolín ayuda a estabilizar y dar consistencia al suelo; y, finalmente, la arena industrial ayuda a mejorar la textura del suelo y la aireación durante la exposición de este organismo, es decir, de 7 a 14 días (Martínez et al., 2019; OECD, s.f.).

2.7. Generalidades de la *Artemia salina*

La *Artemia salina* es un crustáceo acuático que pertenece al grupo de los braquiópodos, que pueden alcanzar hasta 800 μm de longitud cuando llegan a la adultez. Su cuerpo está cubierto por un caparazón blando y se divide en tres partes principales: una cabeza con un ojo central (ojo de nauplio), un tórax con una serie de piernas nadadoras y un abdomen delgado (Figura 3).

Este organismo experimenta un ciclo de vida completo que pasa por cuatro estadios anatómicos y morfológicos durante su crecimiento, desde la eclosión de quistes hasta alcanzar la adultez. Cuando la larva recién eclosiona, se caracteriza principalmente por su ausencia de segmento corporal y tracto digestivo aún en formación, por lo que se presenta un color naranja y se cuenta con un ojo central en la cabeza (ojo de nauplio). En este periodo las larvas pueden medir entre 125 a 250 μm , y luego pasan al segundo estadio de metanauplio, donde se hace evidente la formación de su tracto digestivo. Posteriormente, estas pasan al tercer estadio, donde se presenta el dimorfismo sexual, lo que significa que existen variaciones morfológicas entre los individuos masculinos y femeninos a medida que crecen. Una de estas es que las antenas de los machos se transforman en pinzas fuertes, las cuales sirven para el acto copulativo; mientras tanto, las hembras desarrollan unas pinzas pequeñas con forma de hoja. Finalmente, en el último estadio, las larvas alcanzan la adultez.

Ahora bien, las larvas pueden adaptarse a distintas temperaturas desde los 6 °C hasta los 35 °C. Un rasgo distintivo de estas es que nadan en posición invertida, lo que hace que puedan desplazarse con gran facilidad en el agua. En suma, es una especie cosmopolita con una distribución mundial (Food and Agriculture Organization [FAO], 1996; Hernández y Acosta, 2021).

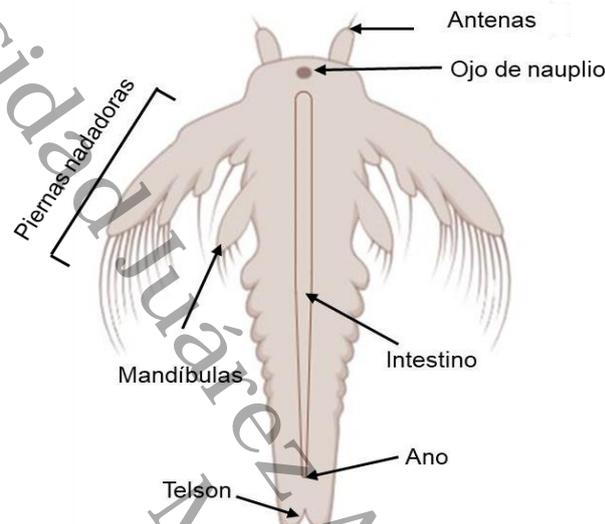


Figura 3.- Partes de la *Artemia salina* en fase nauplio. Ilustración del software BioRender

Los nauplios de las Artemias se usan principalmente en la acuicultura por su fuente de vitaminas, lípidos y proteínas, lo que los hace esenciales para alimentar a peces, flamencos y crustáceos. La *A. salina* es importante en las aguas salinas por ser un filtrador no selectivo, dado que captura todo lo que se encuentra suspendido en la columna de agua. Este organismo tiene la capacidad de bioacumular contaminantes como plaguicidas, metales pesados y compuestos metálicos, entre otros, lo que ayuda a depurar este tipo de sustancias y/o elementos que dañan los ecosistemas acuáticos salinos (Wood et al., 2023). Por lo tanto, se consideran mejores filtradores que otros invertebrados del agua (mejillones, ostras y copépodos), debido a que estos organismos son selectivos a la hora de consumir partículas (Libralato, 2014).

Algunos estudios han evaluado la toxicidad de distintas NP, como $Ca_5(PO_4)_3$ (Monteiro et al., 2023), TiO_2 (Thiagarajan et al., 2022) y CuO (Madhav et al., 2017), y con ello se ha observado que los distintos materiales pueden tener efectos toxicológicos en la *Artemia salina*. Por consiguiente, la ISO/TS 20787:2017 (ISO, 2017) ha estandarizado la *Artemia salina* como modelo



confiable para evaluar la toxicidad de los nanomateriales en aguas salinas, debido a que esta tiene la calidad necesaria y es susceptible a la contaminación ambiental. No obstante, la OECD (1984) utiliza el crustáceo *A. salina* para evaluar la toxicidad de plaguicidas y productos químicos industriales en aguas salinas. Esta especie se utiliza ampliamente en este tipo de ensayos debido a su facilidad de cultivo y su capacidad de adaptarse a condiciones ambientales adversas, entre otras características que la convierten en un organismo modelo ideal (OECD, 1998).

2.7. Antecedentes

El estudio del efecto tóxico que puede tener el óxido de aluminio en forma de nanométrica tiene mayor interés académico en la evaluación de la bioseguridad de estos nanomateriales. Paulatinamente aparecen nuevos trabajos de investigación que buscan probar el nivel de ecotoxicidad e impacto que tiene en el medioambiente y en diversos seres vivos. Sin embargo, a medida que estos nanomateriales encuentran aplicaciones más amplias en las industrias y los productos de consumo, surge la necesidad de investigar detalladamente su interacción con los sistemas biológicos. Se ha reportado que la toxicidad de las NP de Al_2O_3 se ha examinado en varios estudios, mostrando efectos diversos dependiendo del tamaño de las partículas.

En un estudio realizado por Jiang et al. (2009) compararon la toxicidad de diferentes nanopartículas de óxido de aluminio, silicio, titanio y zinc hacia distintas bacterias. Los resultados mostraron que todas las NP, a excepción del óxido de titanio, presentaron mayor toxicidad en comparación con sus equivalentes en forma de micropartículas. Específicamente, las NP de alúmina exhibieron una tasa de mortalidad del 57 % en *Bacillus subtilis*, 36 % en *Escherichia coli*, y 70 % en *Pseudomonas fluorescens* a una concentración de 20 mg/L. estos hallazgos sugieren que la toxicidad de los nanomateriales está asociada al área superficial y la reactividad, lo que resalta la importancia de considerar estas propiedades en la evaluación ambiental y biológicos.



Asimismo, en un estudio de Huanhua et al. (2009) evaluaron la toxicidad de las NP de Al_2O_3 y a granel comercial (Acros) en la especie *Caenorhabditis elegans* en un medio acuoso, bajo condiciones agudas utilizando concentraciones de 0.7, 1.3, 2.7, 6.7, 10.0 y 13.3 mg/L. Los resultados indicaron que las nanopartículas eran tóxicas para las *C. elegans* y afectaban su capacidad productiva. Sin embargo, los autores concluyeron que la toxicidad está influenciada por sus propiedades químicas y físicas, estos hallazgos enfatizan en la importancia de considerar las características de los nanomateriales en la evaluación de su ecotoxicidad.

Además, Sadiq et al. (2011) estudiaron los efectos de las NP de óxido de aluminio comercial (Sigma-Aldrich, <50 nm) en fase gamma y polvo de alúmina a granel (<5µm) en las microalgas *Scenedemus* sp. y *Chlorella* sp. Este estudio se centró en determinar si había inhibición del crecimiento, exponiendo a ambas especies en condiciones agudas empleando concentraciones de 3, 6, 12, 24, 48, 96 y 192 mg/L. Los resultados mostraron una disminución en el contenido de clorofila en las células tratadas tanto con NP como alúmina a granel, lo que indicó toxicidad. Esta reducción en el contenido de clorofila se correlacionó con el aumento del tamaño hidrodinámico, en cambio en las algas favorecieron la agregación de las nanopartículas donde a través del FTIR observaron que la química de la superficie de las células interactúa significativamente entre las partículas y la pared celular, por lo que concluyen que las células de la *Scenedemus* sp., en los agregados de nanopartículas de alúmina podría tener un papel fundamental en la toxicidad en estas especies.

En el estudio de Burklew et al. (2012) evaluaron el efecto de las NP de alúmina en las semillas de tabaco *Nicotiana tabacum* para investigar su potencial en la regulación de microARN. Las semillas fueron expuestas a diferentes concentraciones 0, 0.1, 0.5 y 1.0 %. Los resultados mostraron que, a medida que aumentaba la concentración de NP, la biomasa promedio y la longitud de la raíz del tabaco disminuían. Sin embargo, se observó un aumento significativo en el perfil de microARN. A pesar de estos cambios, las NP de Al_2O_3 no afectaron de manera significativa la tasa de germinación de las plántulas de tabaco.



Por otro lado, Pakrashi et al. (2013) examinaron la toxicidad de NP de Al_2O_3 hacia algas de agua dulce, demostrando efectos citotóxicos significativos a concentraciones tan bajas como $\leq 1 \mu g/mL$. Este estudio subrayó la importancia de considerar no solo la toxicidad directa de las NP, sino también los efectos derivados de la liberación de iones metálicos en el medio. La relación entre las nanopartículas y otros organismos es aún impredecible. Para determinar su destino en el medio ambiente y comprender sus posibles efectos toxicológicos de las NP de Al_2O_3 . El estudio de Doskocz et al. (2017) estudio los efectos de las NP de alúmina en tamaños inferiores a 50 nm, y determinaron sus efectos en las bacterias *Pseudomonas putida*, con el propósito de determinar su ecotoxicidad, para entender mejor su impacto ambiental. Los valores obtenidos de la concentración efectiva 50 (EC_{50}) de 16 h determinada en este estudio fue de 0.5 mg/L y la concentración sin efecto observado (NOEC) de 0.19 mg/L, lo que concluyeron que las NP inhibieron el crecimiento bacteriano, sugiriendo que la morfología y tamaño puede influir en el medio ambiente

En cuanto, Zheng et al. (2019) señalaron que las NP de óxido de aluminio no representan un riesgo significativo para el medioambiente acuático. Esto se debe que las NP podrían no quedarse en un entorno acuático, porque es probable que se remuevan por un efecto de migración. Además, se ha observado que la concentración de estas NP depende de varios factores, como el pH, la salinidad y las materias orgánicas presentes; esto significa que las propiedades en el entorno acuático pueden modificar el riesgo potencial de las NP de alúmina en los ecosistemas acuáticos. Además, Anand y colaboradores (2019) evaluaron el efecto crónico de las nanopartículas de alúmina comercial (Sigma-Aldrich, >50 nm) en la especie *Drosophila melanogaster*. El estudio se realizó a lo largo de todo su ciclo de vida de las moscas, desde la etapa de huevo hasta la adultez, empleando dos concentraciones 0.1 y 1 mM, administrando las NP por ingestión. Con ello reportaron que, tras el periodo de exposición, se observaron anomalías tanto en el comportamiento como en las características fenotípicas, lo que confirma que hubo un impacto negativo de las NP en la *D. melanogaster*. Sin embargo, subrayan la necesidad de una investigación mayor sobre los efectos en diferentes organismos y su implicación en la salud ambiental.



Por otra parte, Chahardoli et al. (2020) llevaron a cabo un estudio sobre los efectos de las NP de Al_2O_3 en el crecimiento de diferentes especies vegetales, tales como el maíz (*Zea mays*), nabo (*Brassica rapa*), pepino (*Cucumis sativus*), arroz (*Oryza sativa*) y helecho de agua (*Salvinia natans*). Los resultados exhibieron que las nanopartículas de alúmina produjeron efectos diversos en los brotes y raíces de las plantas, dependiendo de la concentración aplicada. Se observaron diferencias significativas en respuesta a las concentraciones de 0, 50, 100, 1000 y 2500 mg/L. Además, se reportó que, a concentraciones elevadas, las nanopartículas de óxido de aluminio podrían inducir muerte celular en algunas especies de plantas.

Ahora bien, Krause et al. (2020) administraron NP de Al_2O_3 por vía oral a ratas *Sprague dawley*, utilizando tres concentraciones: 1.99, 3.97 y 7.94 $\mu g/g$. Con esto se observó una alta variabilidad de cambios en los órganos, y se encontraron mayores concentraciones en los órganos centrales (sangre, bazo, riñones) y una menor cantidad en los periféricos (duodeno, colon). Sin embargo, se reportó que el aumento de la dosis y la acumulación en el intestino podrían deberse a la aglomeración de las NP de alúmina a medida que aumentaban las concentraciones. Por tanto, no solo depende de la morfología de las NP, sino también del estado de aglomeración de las partículas, lo que debe considerarse un parámetro clave para la evaluación de la toxicidad.

Asimismo, Nogueira et al. (2020) evaluaron la toxicidad crónica y aguda de las NP de alúmina con dos fases cristalinas: alfa y eta. Para ello utilizaron la pulga de agua (*Daphnia magna*) como organismo de prueba y aplicaron dos concentraciones de 3.12 mg/L y 6.25 mg/L. Los resultados mostraron que no se observaron daños morfológicos evidentes en la especie expuesta. Sin embargo, se observó un efecto mínimo de estrés. A pesar de esto, se reportó que las fases cristalinas de las NP de alúmina parecen influir en la toxicidad observada en el organismo acuático. En otra investigación, Canli (2021) analizó la exposición a nanopartículas de Al_2O_3 en un modelo *in vivo* utilizando tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) aplicando dos concentraciones de 1 mg/L y 10 mg/L. Los resultados mostraron que no presento efectos adversos significativos en la

fisiología de los peces. Sin embargo, se enfatizó la necesidad de realizar estudios adicionales para estimar el potencial nivel de toxicidad de estas nanopartículas, considerando sus múltiples aplicaciones en las industria.

En cuanto al estudio de Alghriany et al. (2022), estos evaluaron el efecto de la combinación de NP de alúmina (6 mg/kg) + nanocurcumina (20 mg/kg) en ratones macho. Las NP se administraron por vía oral durante cuatro semanas, y después de ese periodo se extrajo sangre para estudiar el cuadro hemático completo. Posteriormente, estas se disecaron para obtener y analizar partes del abdomen, como el hígado y la médula ósea. Los resultados mostraron cambios mínimos en el hígado y la médula ósea, y la curcumina tuvo la capacidad de reducir la toxicidad de metales pesados.

En el caso de, Rzayev et al. (2022) estudiaron la bioacumulación de NP de Al_2O_3 en la planta acuática perenne (*Elodea canadensis*) y en el caracol de agua dulce (*Melanopsis praemorsa*) a dos concentraciones: 8 y 25 mg/L. Los resultados mostraron que las NP de alúmina provocaron cambios estructurales en el citoplasma y la pared celular en el caracol que se alimentaba con la planta perenne. En este estudio, se evaluó el estrés oxidativo inducido por dos fases del óxido de aluminio, $\gamma-Al_2O_3$ (5 nm – 0.4 μ m) y $\alpha-Al_2O_3$ (50 nm – 3.5 μ m), en la especie *Gammarus pulex*. Los organismos fueron expuestos a concentraciones de 0, 10, 20 y 40 ppm de $\gamma-Al_2O_3$ y $\alpha-Al_2O_3$ durante periodos de 24 y 96 h. Los resultados mostraron que ambas nanopartículas afectaron los tejidos enzimáticos, posiblemente debido a su interacción con enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD). En particular, la γ -alúmina provocó una disminución en la actividad catalasa (CAT) a las 24 h, mientras que la α -alúmina causó aumentos en la actividad de la catalasa (CAT) de esta enzima. Este estudio concluye que las NP de alúmina pueden alterar notablemente a las respuestas antioxidantes de esta especie, lo que podría tener implicaciones importantes en la salud y bienestar de esta especie (Serdar et al., 2024).



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Capítulo III

JUSTIFICACIÓN, PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



3.1. Justificación

La creciente producción y uso de nanopartículas de alúmina (Al_2O_3) en diversas aplicaciones industriales y tecnológicas han suscitado un interés considerable en investigar sus efectos sobre el medio ambiente y la salud en los organismos vivos. A pesar de su amplia utilización, los estudios sobre la toxicidad y el impacto ecotoxicológico de estas nanopartículas son aún limitados, lo que plantea serias preocupaciones sobre su seguridad.

Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre ecotoxicidad se han centrado en otros nanomateriales, dejando un vacío significativo en la investigación específica sobre la alúmina, principalmente alúmina sintetizada por el proceso sol-gel. Este desconocimiento puede resultar en una subestimación en los riesgos potenciales que estas nanopartículas podrían representar para los ecosistemas acuáticos y terrestres.

La falta de regulaciones específicas en muchos países, incluido México, en relación con el uso de nanomateriales, subraya la necesidad de investigaciones que aseguren la bioseguridad de las nanopartículas de alúmina. Esto es esencial para prevenir posibles efectos adversos en la salud humana y en el medio ambiente. La realización de pruebas ecotoxicológicas de las nanopartículas de alúmina no solo contribuirá a la generación de conocimiento científico, sino que también permitirá establecer directrices y normativas que promuevan un uso seguro y responsable de la nanotecnología.



3.2. Pregunta de investigación

¿Cómo influye la variación en la relación agua-alcóxido durante la síntesis de nanopartículas de alúmina en sus propiedades electrocinéticas, morfológicas, texturales y estructurales, y como afectan estas propiedades en su ecotoxicidad en *Artemia salina* y *Eisenia foetida*?

3.3. Hipótesis

La variación de la relación agua-alcóxido en la síntesis de alúmina mediante el método sol-gel modificado por Yoldas, permitirá controlar el tamaño y estabilidad coloidal de las nanopartículas, lo cual favorecerá una baja toxicidad en los modelos *in vivo* de exposición aguda como *Artemia salina* y *Eisenia foetida*.



3.4. Objetivos

3.4.1. Objetivo general

Evaluar el impacto de las propiedades fisicoquímicas de nanopartículas de Al_2O_3 sobre la ecotoxicidad en dos modelos *in vivo* de exposición aguda.

3.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la relación alcóxido/agua en las propiedades electrocinéticas, morfológicas y estructurales de nanopartículas del Al_2O_3 obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas.
2. Estimar la concentración letal media (CL_{50}) de nanopartículas de Al_2O_3 en dos modelos *in vivo* durante una exposición aguda.
3. Analizar la correlación entre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de Al_2O_3 y su efecto tóxico en los modelos *in vivo* de la *Eisenia foetida* y *Artemia salina*.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Capítulo IV

METODOLOGÍA

4.1. Reactivos

Los reactivos empleados fueron los siguientes: tri-sec-butóxido de aluminio (Sigma-Aldrich, 97 %), ácido nítrico (Meyer, 70 %), glicerol (Meyer, 99.5 %), alcohol etílico (96 %), bromuro de potasio (Meyer, 99 %), dicromato de potasio (Meyer, 97 %), cloruro de benzalconio (Farmacéuticos Altamirano, 1 %), hipoclorito de sodio (Cloralex, 6 %), 2-cloroacetamida (Aldrich, 98 %), solución salina buffer de fosfatos (gíbcó, pH 7.4), naranja de acridina (Sigma-Aldrich, 99 %) y agua desionizada.

4.2. Síntesis de nanopartículas de Al_2O_3 por el método sol-gel modificado por Yoldas

Las NP de alúmina se sintetizaron por el método sol-gel de Yoldas modificado, y se utilizó como disolvente una mezcla de etanol y agua desionizada, donde solo el volumen de agua se modificó a diferentes volúmenes (27, 45 y 63 mL), identificados como Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5 respectivamente. Las síntesis se desarrollaron a una temperatura de 80 °C con agitación vigorosa a 900 rpm en una parrilla de calentamiento (Cole-Parmer), bajo condiciones de reflujo; además, como alcóxido se adicionó mediante goteo el tri-sec-butóxido de aluminio, y como catalizador se añadió ácido nítrico. Finalmente, se adicionó glicerol para estabilizar el sol y tener una textura final homogénea y estable. Asimismo, el material se secó en un horno (Ecoshel) a una temperatura de 70 °C hasta evaporar el disolvente, y se sometió a tratamiento térmico en una mufla (Terlab) a una temperatura de 600 °C durante 2 h con una rampa de calentamiento de 2 °C/minuto para la obtención de las NP de óxido de aluminio. Las muestras obtenidas se tamizaron en un mortero de ágata y posteriormente se guardaron en viales.

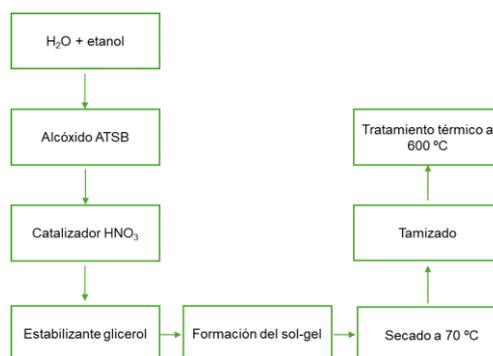


Figura 4.- Procedimiento empleado para la síntesis de NP de Al_2O_3 sintetizadas

4.3. Técnicas de caracterización de las nanopartículas de Al_2O_3 sintetizadas

Para determinar las propiedades estructurales, electrocinéticas y morfológicas de las NP del Al_2O_3 sintetizadas, se emplearon las siguientes técnicas experimentales: la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Los datos se obtuvieron en el espectrómetro FT-IR Nicolet iS50 (ThermoFisher Scientific). Las muestras fueron mezcladas con KBr (98% m/m) y prensadas para formar pastillas a 3 tons (Pike Crusher), las cuales fueron analizadas en modo de absorbancia, en la región de infrarrojo medio de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, los espectros fueron adquiridos con 32 *scans* con una resolución de 16 cm^{-1} .

Para la técnica de difracción de rayos X (XRD) de polvos, las mediciones fueron registradas en un difractómetro D8 Advanced (Bruker AXS), utilizando el detector LynxEye con radiación de Cu K α a una longitud de 1.5418 \AA . Los difractogramas fueron obtenidos en un intervalo de 10° a 90° , a un ángulo de 2θ con un incremento de 0.020 . Posteriormente, se caracterizaron mediante isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno (N_2), a una temperatura de 77 K con un Quantachrome (Autosorb iQ Station 2). Las muestras fueron desgasificadas a 300° C , y se calculó el área superficial específica por el método Brunauer-Emmett-Teller (BET), mientras que la porosidad se determinó mediante el modelo Barrett-Joyner-Halenda (BJH), y la dimensión fractal se obtuvo por el método FHH Adsorption.

Por otro lado, la caracterización por dispersión de luz electroforética (ELS) y dispersión de luz dinámica (DLS) se llevó a cabo en un equipo Zetasizer Nano Zs (Malvern), equipado con un láser de He-Ne ($\lambda=633\text{ nm}$) y con disposición óptica de 173° . Asimismo, las muestras fueron obtenidas en condiciones de sonificado por 60 s , con pulsos de 10 s y 30% de amplitud. Finalmente, se caracterizó por microscopía electrónica con barrido de electrones por emisión de campo en un equipo SEM (JEM-2100) a 10 kV , y las micrografías fueron obtenidas a $25\,000$ y $100\,000$ aumentos.



4.4. Preparación de las nanopartículas de Al_2O_3 para las pruebas *in vivo*

Se pesaron 200 mg de cada nanopartícula en una balanza analítica (Velab) y se suspendieron en 10 mL de agua MilliQ ajustada a un pH de 7. La suspensión se dejó reposar por 120 min y posteriormente se sometieron a sonicación a temperatura ambiente en un equipo ultrasónico (Cole-Parmer) por 120 min para asegurar la dispersión de las NP.

4.5. Evaluación en modelos biológicos

La evaluación ecotoxicológica de las nanopartículas Al_2O_3 es de particular interés debido a la necesidad de tomar decisiones sobre la seguridad de estos materiales, para proteger al medioambiente. Con este fin, se establecieron dos modelos *in vivo* fundamentales en el ecosistema: la lombriz californiana (*Eisenia foetida*) y el camarón de salmuera (*Artemia salina*) para saber el impacto ambiental y su efecto en ambientes acuáticos y terrestres.

4.6. Ensayo de ecotoxicidad aguda en nauplios de *Artemia salina*

4.6.1 Obtención de los nauplios de *Artemia salina*

Para la obtención de los nauplios se utilizaron quistes comerciales de *Artemia salina* (Golden Sun). Los quistes fueron hidratados en agua destilada estéril durante 60 min con aeración continua, posteriormente se desencapsularon en una solución de hipoclorito de sodio al 50% y los quistes se lavaron de tres a cuatro veces con agua destilada estéril hasta eliminar el hipoclorito de sodio, posteriormente se desinfectaron en una solución de cloruro de benzalconio al 3% para eliminar la carga bacteriana asociadas al quiste y de nuevo se lavaron con agua destilada estéril (FAO, 1996). Estos se depositaron en 2L de solución al 3.5 % de sales marinas artificiales y se mantuvieron con fuerte aireación por 24 h en un envase cónico a temperatura ambiente. Después de las 24 h, los quistes flotantes se eliminaron y los nauplios eclosionados fueron utilizados para la actividad experimental.

4.6.2 Ensayo de toxicidad aguda

Para el ensayo de ecotoxicidad en nauplios de *Artemia*, se utilizaron microplacas de poliestireno de 24 pozos en un volumen de trabajo de 2 mL. Se prepararon soluciones de las NP de alúmina con distintas relaciones molares en alcóxido:agua a las concentraciones de 125, 100, 75, 50 y 25 mg/L, y a cada solución se le agregaron 10 nauplios (verificándose la movilidad y nado libre). Como control positivo se utilizó dicromato de potasio a concentraciones de 15, 30 y 60 mg/L siguiendo la norma NMX-AA-110-1995 (Centro de Calidad Ambiental, 1995). Como controles negativos se emplearon los nauplios sin la presencia de las NP de alúmina. Los ensayos se realizaron por triplicado, las microplacas se mantuvieron a temperatura ambiente por 48 h. A las 24 y 48 h de exposición a las NP de alúmina, se contabilizaron las *Artemias* vivas (con nado libre constante) y muertas.

4.6.3. Análisis de daño celular en nauplios de *Artemia salina*

Para evaluar los posibles daños citotóxicos de las NP de Al_2O_3 en nauplios de *Artemia salina*, se empleó la técnica de tinción de naranja de acridina como marcador fluorescente. Para ello, los nauplios después de las 48 h de exposición a las NP de alúmina y sus respectivos controles, se les adicionó 5 mg/L de naranja de acridina a cada pocillo y éstos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se realizaron de dos a tres lavados con solución salina de buffer de fosfatos a pH 7.4, hasta retirar el exceso del colorante (Pinheiro et al., 2022). Los nauplios teñidos fueron examinados bajo un microscopio óptico de epifluorescencia (Nikon eclipse modelo H550S).

4.6.4. Análisis de la concentración letal media (CL_{50})

El número de nauplios inmóviles de cada pocillo se contaron a las 24 y 48 h con ayuda de un microscopio estereoscópico (Zeiss modelo Stemi DV4). Esto, a fin de calcular la concentración letal media (CL_{50}). Adicionalmente en un microscopio óptico Zeiss (Primo Star) con un aumento de 40x, se observaron

detalles de cambios en la coloración y morfología en los nauplios. El porcentaje de la mortalidad se calculó, utilizando la fórmula de Abbott (Delgado, 2014).

$$\% \text{ de mortalidad} = [(x / y)] * 100$$

x = número de nauplios muertos al final del ensayo

y = número de nauplios vivos al inicio del ensayo

Con los datos acumulados de cada síntesis a distintas concentraciones, junto con su control positivo, se calcularon la desviación estándar y la regresión lineal (R^2). Los datos fueron comparados mediante Excel y se determinó la concentración letal media (CL_{50}) utilizando el software StarGraphic y un análisis Probit.

4.7. Ensayo de ecotoxicidad aguda en *Eisenia foetida*

4.7.1. Obtención de la lombriz *Eisenia foetida*

Las lombrices de tierra *Eisenia foetida* fueron adquiridas con un distribuidor comercial (Coahuila, Tabasco) fueron colocadas y mantenidas en un contenedor de plástico cubiertas con una tela mosquitera para conservar la oxigenación y una temperatura de 28 ± 2 °C, en condiciones de oscuridad y humedad constante.

Se le suministró como fuente de alimento estiércol de borrego. Para los experimentos, se seleccionaron lombrices adultas sanas y clitelados. Estas fueron colocadas en una servilleta húmeda durante 2 h, con el fin de permitir la defecación de los organismos y posteriormente se pesaron y se utilizaron aquellas cuyo peso estaba entre los 3 a 5 g.

4.7.2. Ensayo de toxicidad aguda

Se preparó el suelo artificial con la siguiente composición en masa: 10 % de turba de musgo de Sphagnum, 20 % de arcilla de caolín y 70 % de arena industrial. Se pesaron 750 g (And, modelo Ej-2000). El suelo tuvo un pH a 6 y fue homogenizado por adición de 200 mL de agua destilada, y posteriormente se



colocó en contenedores de plástico con capacidad de 1L. Para los ensayos, se emplearon concentraciones de 1000, 100, 10, 1 y 0.1 mg/kg de la diferentes síntesis. Como control positivo se le adicionó 2-cloroacetamida a concentraciones 14, 28 y 57 mg/kg, y como control negativo el suelo sin las nanopartículas. Posteriormente, se colocaron 10 organismos adultos clitelados en cada muestra recipiente con suelo artificial. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado (OECD, 1984) y se les colocó una tapa con pequeñas perforaciones para oxigenación. Las unidades experimentales se colocaron en un ambiente a 22 °C y los especímenes de *E. foetida* fueron inspeccionados a los 7 y 14 días posteriores.

4.7.3. Parámetros evaluados en las lombrices *Eisenia foetida*

Se contabilizaron las lombrices vivas y muertas de cada unidad experimental a los 7 y 14 días. Después del periodo de exposición, se sacaron las lombrices cuidadosamente del contenedor y enseguida se lavaron con agua destilada hasta quitar el exceso de suelo artificial. Posteriormente, se pesaron (And, modelo Ej-300) y se registró el número de organismos vivos y muertos, así como su reacción a estímulos mecánicos, movimiento, coloración y secreción de líquido celómico (expulsión de líquido amarillo), (Ramírez y Mendoza, 2008).

4.8. Análisis de resultados

Los datos de respuesta se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95%, y los resultados se presentaron como media \pm desviación estándar.



Universidad Juárez Autónoma
de Tabasco.
México.

Capítulo V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se ha reportado que los diferentes parámetros de síntesis en el proceso sol-gel influyen en el tamaño y la forma de los materiales resultantes (Ramírez et al., 2010; Rojas, 2012; Alabada et al., 2023). En este trabajo se buscó la síntesis de NP con tamaños inferiores a 100 nm, con la finalidad de evaluar su ecotoxicidad y contribuir al desarrollo de nanomateriales bioseguros o menos dañinos para el medio ambiente.

En la Figura 5 se muestran las imágenes de microscopía con barrido de electrones por emisión de campo donde se aprecia que, de manera general, los tres materiales exhiben aglomerados desde 500 nm hasta varias micras, compuestos de partículas más pequeñas (Figura 5, d, e y f). Además, no se observa una diferencia importante en la forma y la aglomeración de las partículas con respecto a la relación alcóxido:agua.

No obstante, al observar a mayor acercamiento (Figura 5, a, b y c), el material 1:1.5 muestra partículas individuales mejor definidas en comparación con las muestras 1:2.5 y 1:3.5, con tamaños estimados entre 20 y 70 nm. Para la muestra a 1:2.5, además de aglomerados de nanopartículas, se observan agregados de partículas en donde no pueden identificarse claramente partículas pequeñas individuales. Un comportamiento similar se observa para la muestra 1:3.5.

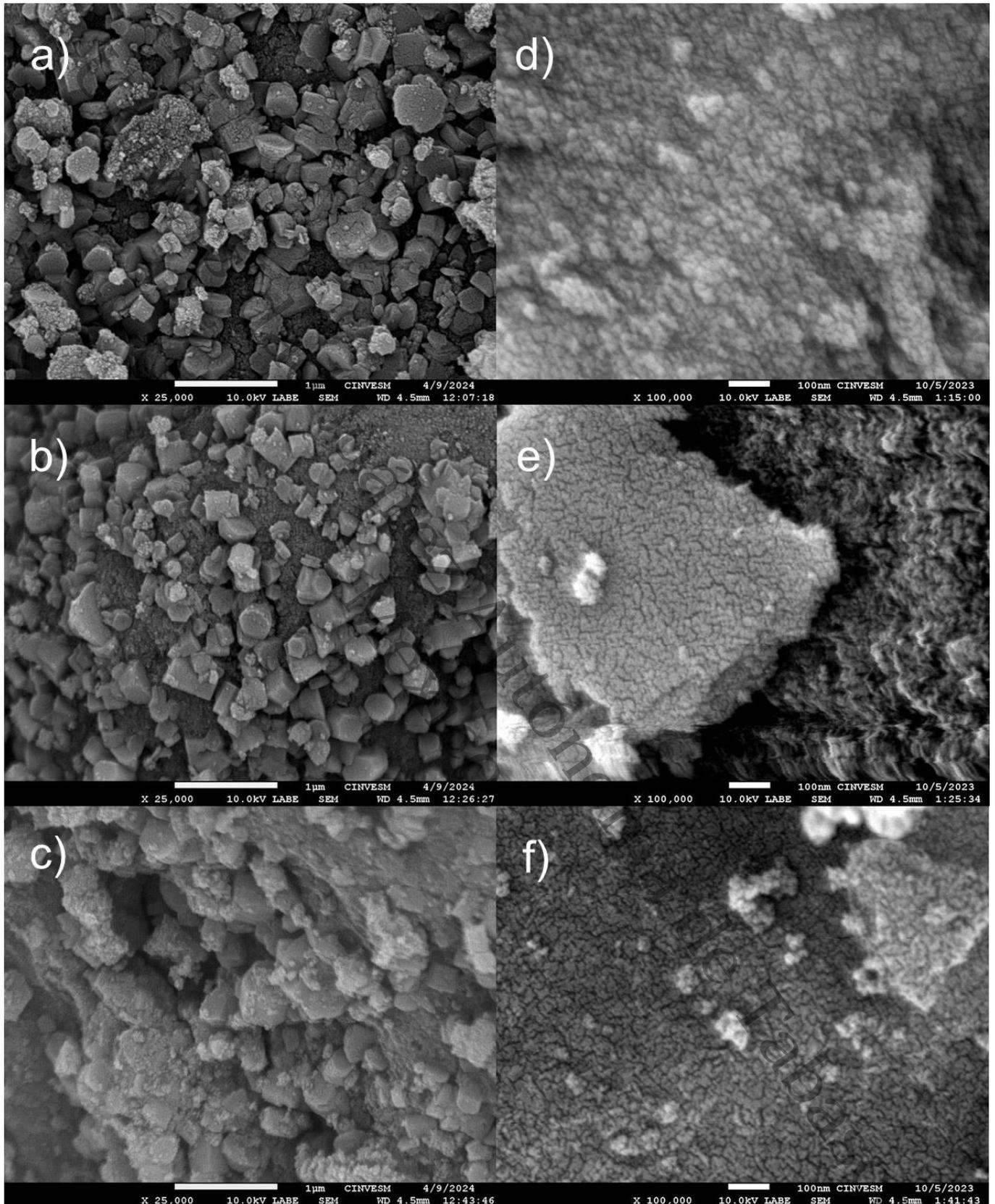


Figura 5.- Micrografías SEM de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua. a) y d) $\text{Al}1:1.5$, b) y e) $\text{Al}1:2.5$ y c) y f) $\text{Al}1:3.5$ a 25,000x (a-c) y 100,000x (d-f)

Sharma et al. (2022) emplearon glicerol en la síntesis para la obtención de NP de Al_2O_3 a partir del tri-sec-butóxido de aluminio, obteniendo una relación molar alcóxido:agua de 1:27.128. De esa forma, las partículas generadas mostraron aglomerados con tamaños de alrededor de 50 nm.

En otro estudio, Mohammed et al. (2020) evaluaron el impacto del método sol-gel en las propiedades de α -alúmina, donde se observó que, a partir del nitrato de aluminio, en condiciones de pH 2 y 3, se obtuvieron aglomerados constituidos de NP, obteniendo tamaños entre 15 y 45 nm. Con esto, se puede concluir que la obtención de alúmina a partir de isopropóxido de aluminio a pH 4 con HNO_3 favorece la obtención de NP poco aglomeradas, en contraste con el uso de un pH 10 con NH_4OH (Kim et al., 2000).

Por otro lado, en un estudio de Alabada et al. (2023) se determinó el efecto de diversos parámetros de síntesis (contenido de ácido, relación alcóxido:agua y tipo de secado) en el rendimiento de la reacción de formación de partículas de Al_2O_3 . Al respecto, se reporta que, independientemente del tipo de secado (convencional y supercrítico) y los contenidos de ácido, las partículas obtenidas no tienen forma ni tamaño homogéneos, por lo que más bien tienden a la formación de agregados micrométricos. Respecto al uso de otros ácidos como peptizantes de la reacción de formación de la alúmina a partir del nitrato de aluminio $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, se ha evaluado el efecto de la fuerza del ácido empleado, con lo que se han obtenido ácidos fuertes: ácido clorhídrico y nítrico (HCl y HNO_3) que promueven la formación de aglomerados y agregados de NP con tamaños menores a 75 nm, mientras que los ácidos débiles: ácido cítrico y acético ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ y CH_3COOH) favorecen la obtención de partículas con baja aglomeración, pero con tamaños superiores (Mohammed et al., 2017).

Adicionalmente, se puede decir que el uso de condiciones ácidas en la síntesis de NP tiene efecto en la formación de aglomerados o partículas individuales. Sin embargo, esta formación de aglomerados depende también de otros parámetros, como la ruta de síntesis, los precursores utilizados y la naturaleza del ácido.



En la literatura, no se encontraron muchos reportes acerca del uso de glicerol como estabilizante en la síntesis de NP de Al_2O_3 , pero si en la preparación de otros óxidos metálicos, por ejemplo en un estudio realizado para la obtención de ZnO con glicerol como estabilizante, se evaluó el efecto del contenido del estabilizante con respecto al de Zn^{2+} , obteniendo que en condiciones de pH 12, se modifican la forma y el tamaño de las partículas; además, esto tiene un papel importante para disminuir la aglomeración de éstas, porque al aumentar la relación glicerol: Zn^{+2} se disminuyen el tamaño de partícula y la aglomeración, logrando obtener partículas de aproximadamente 20 nm al emplear la relación glicerol:Zn 3.3:1 (Wang et al., 2018).

Adicionalmente, se ha reportado que el uso de glicerol con MgO en condiciones ácidas puede dar lugar a tamaños de 46 nm al emplear concentraciones de entre 5 % y 50 % de glicerol, con lo que se puede obtener una menor aglomeración al emplear el 20 %. Esto sugiere que ciertas cantidades moderadas de glicerol pueden facilitar la obtención de NP menos aglomeradas (Nyabadza et al., 2023).

En el presente trabajo, la relación molar glicerol:alcóxido empleada fue de 0.15:1, y se observó que el tamaño de partícula es nanométrico; pero, de acuerdo con estudios realizados con otros alcóxidos, podría inferirse que la cantidad empleada de glicerol no fue suficiente para prevenir por completo la aglomeración. De ese modo, y con base en los resultados y la literatura, puede concluirse que la relación alcóxido:agua empleada en este trabajo tiene un efecto poco significativo en el tamaño y la morfología de las partículas; no así, el uso de condiciones ácidas durante la síntesis ya que promueve la obtención de NP aglomeradas.

5.2. Difracción de rayos X (DRX) de polvos

La técnica de difracción de rayos de polvos es fundamental para identificar las fases cristalinas de materiales, sobre todo cuando estos pueden exhibir más de una estructura cristalina, como el caso de la alúmina. La temperatura de tratamiento térmico a la que se sometieron los nanomateriales obtenidos en el presente trabajo favorece la obtención de la fase γ (gamma), que es de particular

interés por su amplio uso en la industria química, la catálisis y la industria aeroespacial. En la Figura 6 se muestran los difractogramas en un intervalo de 10° a 90° (2θ) de las muestras de Al_2O_3 sintetizadas. La variable estudiada fue la relación molar alcóxido:agua.

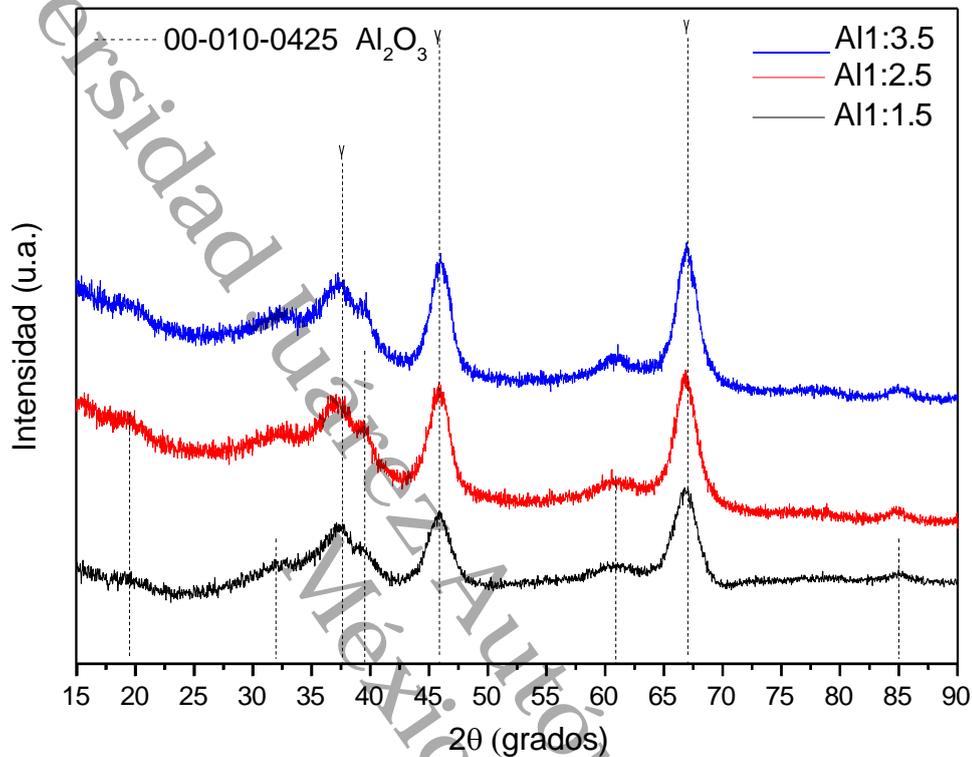


Figura 6- Difractogramas DRX de las NP de Al_2O_3 calcinados a 600°C , obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5

Se puede observar que, los difractogramas de los tres materiales presentan picos anchos e intensos localizados a 37° , 45° y 67° , lo que corresponde a las reflexiones (311), (400) y (440) respectivamente (JCPDS 00-010-0425). La ausencia de señales claras de otras fases permite inferir que, en los tres materiales, la fase gamma (γ) de la alúmina está presente, y ésta corresponde a un arreglo cristalino cúbico. Igualmente, se observa que la forma y la intensidad de los picos son similares para los tres materiales, lo que aparentemente indica que no hay cambios debido a las diferentes concentraciones de agua empleadas en la síntesis. Sin embargo, al determinar el tamaño del cristalito (Tabla 1) para las reflexiones (400) y (440), se encontró que, el material con la relación 1:2.5 presenta un ligero incremento en este parámetro para la reflexión (400) en

contraste con los otros dos materiales, pero no existe una diferencia importante en el tamaño del cristalito calculado para la reflexión (440).

Tabla 1.- Tamaño de cristalito de las muestras, calculado a través de la ecuación de Scherrer, para las reflexiones de los planos (400) y (440)

Muestra	Tamaño de cristalito (nm)	
	(400)	(440)
Al1:1.5	55.9	61.7
Al1:2.5	61.7	61.7
Al1:3.5	55.9	58.7

Sharma et al. (2022) reportaron que, al someter las muestras a tratamiento térmico a $600^\circ C$ para la obtención de NP de Al_2O_3 a partir del tri-sec-butóxido de aluminio, se obtuvo la fase cristalina γ -alúmina, lo que se confirmó con la carta cristalográfica (JCPDS 00-010-0425).

En un estudio realizado por Sifontes et al. (2014) mediante el método sol-gel modificado por Yoldas con extracto de colofonia y oleorresina de pino (*Pinus caribaea*), se obtuvieron NP de γ -alúmina, que se calcinó a $600^\circ C$ por 6 h a una velocidad de calentamiento de $5^\circ C/min$. Los autores reportaron que en el difractograma se apreciaron tres picos intensos correspondientes a los planos (311), (400) y (440) de γ -alúmina. En cuanto a Milani et al. (2020), estos obtuvieron unas NP de Al_2O_3 por el método de síntesis inorgánica a partir de la sal de nitrato de aluminio. En ese sentido, el gel resultante fue sometido a tratamiento térmico a una temperatura de $600^\circ C$ por 2 h. Los resultados exhibieron tres picos intensos que corresponden a las señales 37° , 45° y 67° , los cuales pertenecen a la formación de γ -alúmina, pero el tamaño de cristalito no fue reportado. En suma, los resultados de este estudio fueron similares a lo reportado en este trabajo, a pesar de no haber utilizado el extracto ni el mismo precursor, lo que indica que, para la estabilización de la fase cristalina, la temperatura de calcinación es el parámetro con mayor influencia.

Por otra parte, se reportó la síntesis de NP de óxido de aluminio por el método de precipitación asistido por vibración ultrasónica, donde se observó que, a partir



del nitrato de aluminio y calcinado a $550^{\circ}C$ se obtuvo la fase γ -alúmina, como lo confirmó la presencia de las señales a 37.8° , 45.7° y 66.9° (2θ), las cuales se asignaron a las reflexiones de los planos (311), (400) y (440) de dicha fase cristalina, tampoco fue reportado el tamaño de cristalito.

En el caso de Lamouri et al. (2017), ellos estudiaron el efecto de distintas temperaturas 550° - $950^{\circ}C$ y velocidades de calentamiento (5° , 10° y $20^{\circ}C/min$) utilizando polvo crudo de óxido de aluminio como materia prima para analizar el proceso de compactación y microestructura. El tamaño del cristalito no fue reportado; sin embargo, se encontró que, al calcinar los materiales en el rango de temperatura de 550° - $850^{\circ}C$ a una velocidad de $5^{\circ}C/min$, se obtuvo la fase γ -alúmina. Mientras tanto, al calcinar a $950^{\circ}C$ a las velocidades de 10° y $20^{\circ}C/min$ se favoreció la formación de la fase δ -alúmina. Esto indicó que la rampa de calentamiento y el tiempo de permanencia a cierta temperatura tienen un efecto significativo en la formación de fases cristalinas deseadas en el óxido de aluminio.

Ahora bien, la temperatura de calcinación tiene un impacto importante en las fases cristalinas que exhibe la alúmina, lo que influye seguramente en su desempeño en cualquier aplicación. Cabe destacar que, a pesar de no haber información respecto al efecto de la adición de glicerol en las propiedades estructurales de la alúmina, se sabe que también puede emplearse no solo para prevenir la aglomeración y facilitar la obtención de NP, sino también que puede ser un agente reductor que promueve la obtención de NP metálicas y de óxidos, dependiendo de la relación glicerol:precursor empleada (Cristino et al., 2020).

Se puede asumir, con base en los resultados obtenidos, que existe un ligero cambio en las intensidades de las fases observadas en las reflexiones (311), (400) y (440) para las muestras $Al1:2.5$ y $Al1:3.5$. Este se atribuye al exceso de agua en la etapa de gelificación, lo cual resulta en una red menos densa y más amorfa, impidiendo así el adecuado crecimiento de los cristales (Brinker y Scherer, 1990). La cantidad de agua también afecta la velocidad de polimerización de los alcóxidos, lo que influye la formación de la estructura cristalina (Sathiyakumar y Gnanam, 1999). Por otro lado, se observó que la

adición de glicerol no presenta diferencias en las posiciones de los picos. De acuerdo con estos resultados y la literatura, se puede concluir que la relación alcóxido:glicerol empleada en este trabajo no influye en la obtención de una fase de cristalinidad específica de la alúmina. En cambio, el uso de condiciones en la síntesis, la rampa de calentamiento y el tiempo a cierta temperatura ejercen un efecto significativo en la formación de fases cristalinas deseadas en el óxido de aluminio.

5.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica que se emplea principalmente para identificar grupos funcionales en diversos materiales. Dado que, en este trabajo se empleó un aditivo durante la síntesis (glicerol), es de particular interés identificar la presencia de residuos orgánicos derivado de la presencia de dicho compuesto. En la Figura 7 se muestran los espectros de la región media del infrarrojo (4000 a 400 cm^{-1}) de las muestras de Al_2O_3 sintetizadas. La variable estudiada fue la relación molar alcóxido:agua.

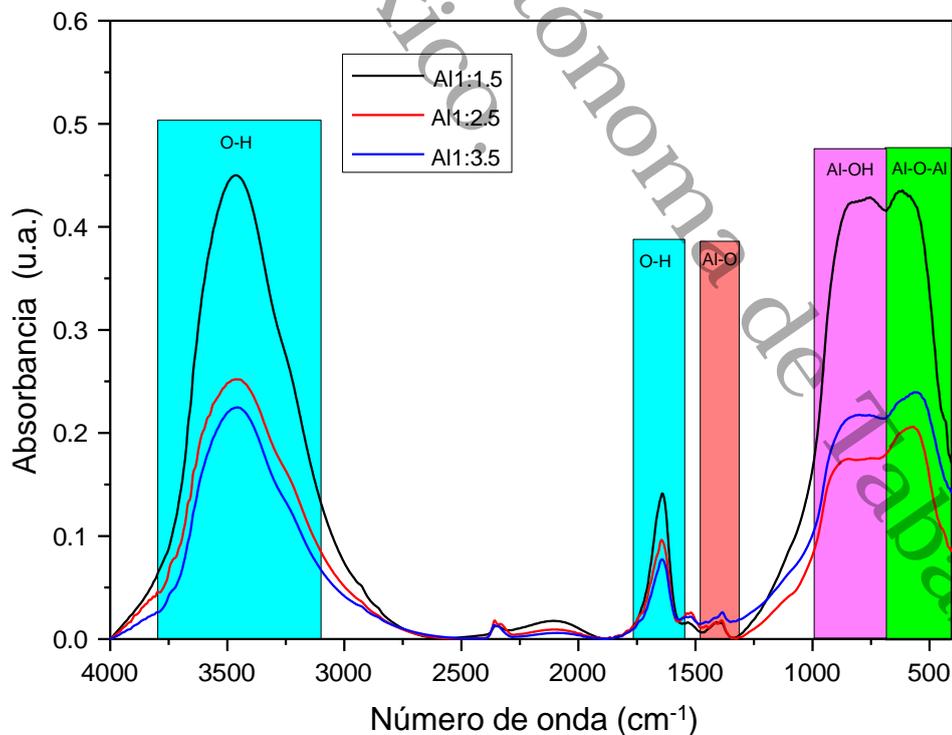


Figura 7.- Espectros FTIR de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua $Al1:1.5$, $Al1:2.5$ y $Al1:3.5$. las muestras fueron mezcladas con KBr

Se puede observar la presencia de bandas en tres regiones del espectro. En la región de 3700 a 3200 cm^{-1} los espectros exhiben bandas anchas con diferentes intensidades. Considerando como referencia la muestra $\text{Al}1:1.5$, esta banda aparece centrada en 3468 cm^{-1} , mientras que para las muestras $\text{Al}1:2.5$ y $\text{Al}1:3.5$ estas se desplazan hacia los 3487 y 3474 cm^{-1} respectivamente, las cuales se atribuyen a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H (Figura 7). Los resultados exhiben que existen grupos O-H aún después del tratamiento térmico, lo que indica que están unidos al Al_2O_3 (Tafreshi y Khanghah, 2015; Romero et al., 2018).

Asimismo, en la región de 1600 a 1500 cm^{-1} , se puede apreciar que los tres materiales exhiben bandas con distintas intensidades, considerando como referencia la muestra $\text{Al}1:1.5$. Esta banda aparece centrada en 1638 cm^{-1} , mientras que para las muestras $\text{Al}1:2.5$ y $\text{Al}1:3.5$ se desplaza hacia 1645 y 1643 cm^{-1} respectivamente. Estos picos están asociados con los H-O-H relacionados con la flexión de moléculas de aguas adsorbidas, apreciándose que las intensidades son relativamente menores en comparación a las regiones 3700 a 3200 cm^{-1} . Sin embargo, en los tres materiales se puede apreciar un pico en particular en la región de 1400 a 1300 cm^{-1} , que se identifica como la señal de vibración de tipo estiramiento de los enlaces Al-O (Liu et al., 2012).

Por otro lado, en la Figura 8 se muestra la región de 1300 a 400 cm^{-1} , donde se observa que para los tres espectros esta banda se puede interpretar como la contribución de dos señales. La primera alrededor de 835 cm^{-1} que aparece para la muestra $\text{Al}1:1.5$, mientras que para las muestras $\text{Al}1:2.5$ y $\text{Al}1:3.5$ esta se desplaza hacia los 873 y 882 cm^{-1} respectivamente. Tales bandas se atribuyen a las vibraciones de los enlaces Al-O-H (Sharma et al., 2022) y su desplazamiento hacia números de onda mayores, que generalmente pueden atribuirse a cambios en la fuerza de interacciones de enlaces de hidrógeno, lo cual en este caso podría atribuirse a ligeras diferencias en la estructura de los poros, o bien en cambios en las longitudes de los enlaces asociados a cambios en la electronegatividad del átomo vecino (OH), lo cual puede asumirse debido a la variación del contenido de agua en la síntesis del óxido.

Finalmente, en la región de 600 a 500 cm^{-1} , se observa que la señal alrededor de 600 cm^{-1} se desplaza hacia números de onda menores para los materiales $\text{Al}1:2.5$ y $\text{Al}1:3.5$, lo cual podría interpretarse como una disminución en las energías del enlace Al-O-Al , y ello disminuye la libertad de vibración. Múltiples estudios aseguran que las bandas localizadas entre 1000 a 800 cm^{-1} y 600 a 400 cm^{-1} confirman la formación de Al_2O_3 (Ádám et al., 2023; Magesan et al., 2024; Anna et al., 2023; Amer et al., 2022).

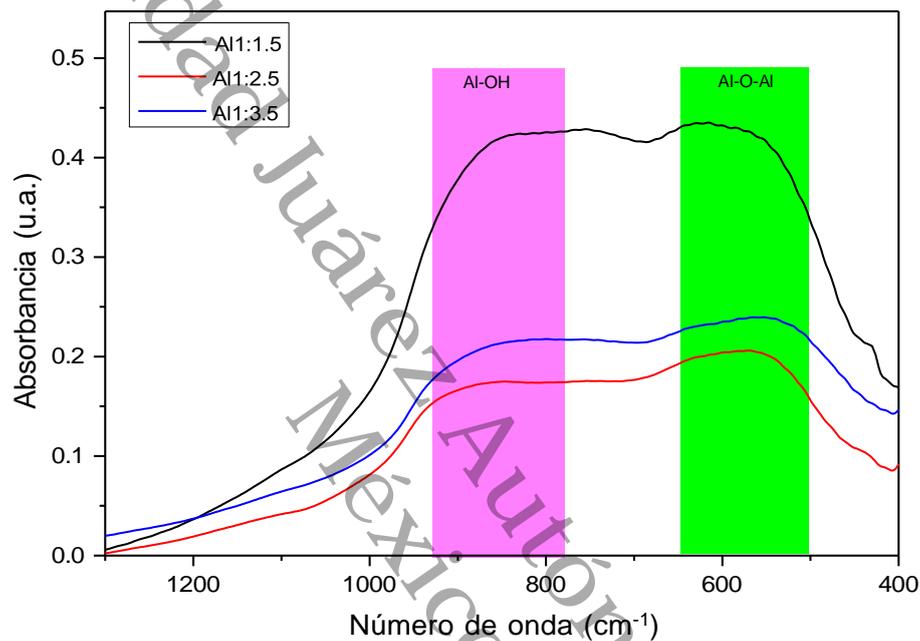


Figura 8.- Región de 1300 a 400 cm^{-1} de los espectros FTIR de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua $\text{Al}1:1.5$, $\text{Al}1:2.5$ y $\text{Al}1:3.5$. las muestras fueron mezcladas con Kbr

En un estudio realizado por Liu et al. (2012) se evaluó el efecto de las NP de Al_2O_3 comercial (BDH Chemicals) y se reportó la importancia del área superficial. Estas NP puras fueron sometidas a un tratamiento térmico a 650° C durante 3 h, lo que resultó en la obtención de γ -alúmina. Los resultados exhibieron una banda ancha en 3450 cm^{-1} , atribuida al enlace de los O-H, mientras que la banda 1639 cm^{-1} pertenece al mismo grupo de enlaces H-O-H, pero con menor intensidad. En 1397 cm^{-1} se puede apreciar un pico que se identifica como el estiramiento del enlace Al-O , y en la huella dactilar en 759 cm^{-1} se identificaron los enlaces Al-O-H y a 630 cm^{-1} , que se atribuyeron a los enlaces del Al-O . Van Truong y Kim (2022), estudiaron las características de la γ -alúmina sintetizada a partir del hidróxido de aluminio. En los espectros de IR obtenidos, atribuyeron la región

de 3273 a 3368 cm^{-1} a los enlaces vibracionales de estiramiento de los O-H, mientras que a la banda de 1636 cm^{-1} correspondieron el enlace H-O-H del agua adsorbida. Además, en la región de 1064-1068 cm^{-1} se identificaron los enlaces de flexión simétrica Al-O-H, y en la región 400 a 500 cm^{-1} se encontraron los enlaces del Al-O-Al. Por su parte, Sifontes et al. (2014) sinterizaron NP de alúmina por el método de sol-gel modificado por Yoldas con resina de colofonia extraído de una especie de pino (*pinus caribaea*). Entre los resultados, se observó una banda amplia en la región de 3700 a 3000 cm^{-1} , y estos se atribuyeron a los grupos funcionales del O-H, mientras que a la región alrededor de los 1636 cm^{-1} correspondió el mismo grupo, pero con vibraciones de flexión. Respectivamente, en la banda localizada de 1470 cm^{-1} se asignaron los enlaces de estiramiento Al-O, y en las regiones de 900 a 400 cm^{-1} se vieron las vibraciones de enlace Al-O-H y Al-O de la red del óxido.

Finalmente, Ojok et al. (2023) describieron la obtención de NP de óxido de aluminio por el método de sol-gel a partir del hidróxido de aluminio y almidón, donde los residuos de yuca (*Manihot esculenta*) se señalaron como materia prima. Esto se caracterizó por espectroscopía infrarroja (IR) para analizar la estructura química de la alúmina resultante, donde se puede observar que al rango de 3400 a 3200 cm^{-1} se atribuyen las vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilo (-OH) correspondientes a la adsorción de moléculas de agua. Asimismo, en la región 840 a 740 cm^{-1} se observaron bandas amplias que se asignan a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-Al, Al-OH y Al-O, lo que significa que en esta región indica la formación de la estructura química completa de la alúmina (Al_2O_3). De lo anterior, se puede concluir que los desplazamientos en las principales bandas del espectro infrarrojo del Al_2O_3 se deben a las condiciones de síntesis empleadas que difieren de lo reportado en la literatura, provocando ligeras modificaciones en las energías vibracionales de los enlaces de los átomos del óxido. Sin embargo, la síntesis con menor proporción de agua Al1.1.5 presentó una mayor señal en el IR. Esto puede deberse que los grupos O-H o Al-OH es más alta debido a la menor dilución. Como resultado, se observó una mayor intensidad de las bandas del espectro, ya que la absorción es proporcional a la concentración de los grupos que generan la señal Liu et al. (2013). Es relevante señalar que, a pesar de no

haber restos del glicerol en las estructuras de la alúmina, se sabe que este también puede ser utilizado no solo para la prevención de la aglomeración y para facilitar la obtención de nanopartículas, sino también como estabilizante. En suma, se puede concluir que la temperatura de calcinación ejerce un papel crucial en la eliminación de impurezas y compuestos no deseados en el material final, lo que permite garantizar su eficacia en aplicaciones específicas.

5.4. Fisorción de nitrógeno

La fisorción de nitrógeno se utiliza principalmente para caracterizar materiales mesoporosos y determinar propiedades como área superficial, distribución del tamaño de poros y dimensión fractal. La interacción entre nanomateriales y sistemas biológicos puede verse afectada por las características texturales de las primeras, por lo que es importante identificar cómo se modifica la textura en función de la variación del contenido de agua en la síntesis del óxido de aluminio preparado en este trabajo. En la Figura 9 se muestran las isotermas de adsorción-desorción de N_2 de las muestras del óxido de aluminio sintetizados con distintas relaciones molares de alcóxido:agua.

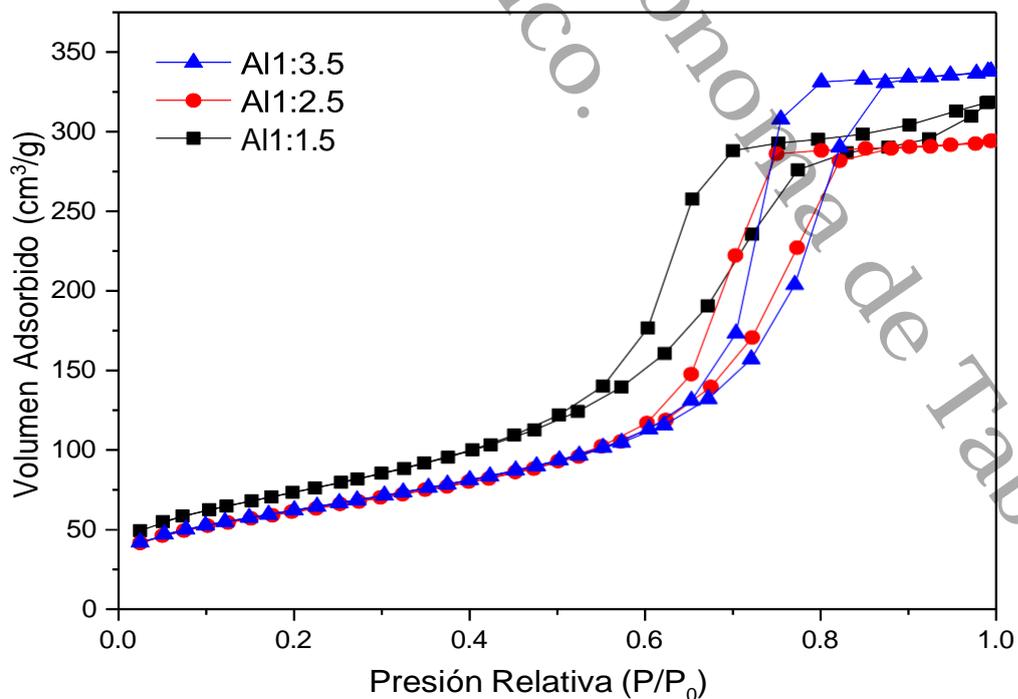


Figura 9.- Isotermas de adsorción-desorción de N_2 de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5



De los datos obtenidos se observa que las muestras exhiben un volumen inicial adsorbido muy similar cercano; sin embargo, existe una variación en el volumen final que es menor para la muestra Al1:2.5. Las tres isothermas son del tipo IV(a) con la formación de histéresis de tipo H2(b), de acuerdo con la clasificación de Thommes et al. (2015), la cual es característica de materiales mesoporosos, como lo indican el límite en la adsorción a presiones relativas cercanas a 1 y la ausencia de adsorción a presiones relativas cercanas a 0. Existe una diferencia entre las isothermas en cuanto a la zona de la condensación capilar y, por ende, en el lazo de histéresis y las presiones relativas a las cuales esto ocurre. Los valores de área especificados con el método BET se muestran en la Tabla 2, donde se observa que la muestra Al1:1.5 presenta el valor más alto, mientras que las muestras Al1:2.5 y Al1:3.5 muestran valores muy cercanos, tal como se infiere de la forma y el volumen adsorbido de la isoterma de adsorción en el rango de 0.05-0.35 P/Po (Yao et al., 2001; Sharma et al., 2022; Dhainaut et al., 2016; Aguado et al., 2005).

De esa forma, a partir de la ecuación de BET:

$$\frac{p/p^{\circ}}{n(1 - p/p^{\circ})} = \frac{1}{nmC} + \frac{C - 1}{nmC} (p/p^{\circ})$$

se puede obtener el valor de la constante C, la cual es un indicativo de las interacciones adsorbente-adsorbato. De los valores obtenidos, se observa que la muestra Al1:1.5 tiene un valor más bajo que las otras dos, lo que implica que las interacciones entre la superficie del material y el N_2 adsorbido son menores en comparación con otras dos muestras estudiadas. Esto también podría tener repercusiones en la forma en que la superficie del óxido de aluminio interactúa con las biomoléculas presentes en sistemas biológicos, teniendo una mayor o menor afinidad. Los resultados obtenidos de esta técnica se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Valores de fisisorción de N_2 de las nanopartículas de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5. Los parámetros texturales fueron obtenidos a partir de las curvas de desorción y adsorción de N_2 a 77 k

Muestra	SBET (m^2/g)	Volumen de poro (cm^3/g)	Promedio de poro (nm)	CBET	Dimensión fractal
Al1:1.5	266	0.529	5.6	98	2.73
Al1:2.5	218	0.479	6.6	131	2.71
Al1:3.5	222	0.549	7.9	122	2.66

Por otro lado, las curvas de adsorción-desorción pueden también emplearse para estimar un parámetro llamado “coeficiente de dimensión fractal (D)” (Sun et al., 2020; Wang et al., 2022). Este valor es un indicativo de la rugosidad de una superficie, tomando valores entre 2 y 3, donde 2 implica una superficie lisa. A partir de la estimación realizada al emplear el método de FHH (Freundlich-Harkins-Hill) y los datos de adsorción, se obtuvo que las muestras tienen un valor de rugosidad por encima de 2.5, lo cual permite pensar que las superficies tienen una rugosidad importante. Si bien las variaciones en este valor para las tres muestras son pequeñas, se puede considerar que el Al1:3.5 tiene una superficie ligeramente menos rugosa que el resto de las muestras. Asimismo, se observó que los efectos de la tensión superficial del adsorbato de las tres muestras presentan una distribución de poro monomodal para las muestras Al1:1.5 y Al1:3.5, y para la muestra Al1:2.5 se observa una distribución bimodal.

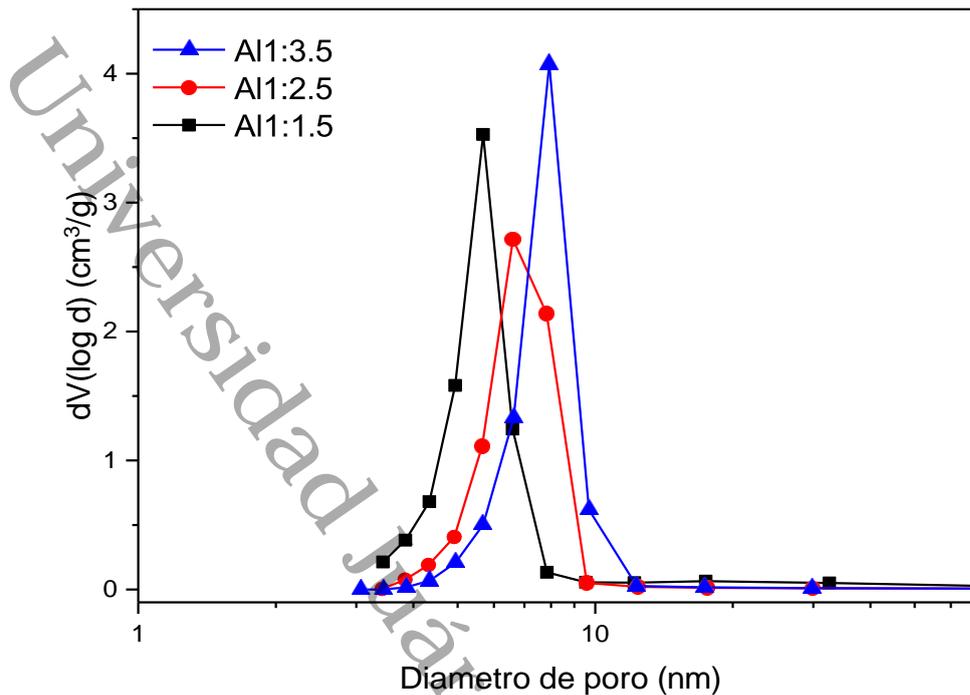


Figura 10.- Distribución de tamaño de poros de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5.

En la Figura 10 se muestra la distribución de tamaño de poro estimada a través del método BJH (Barrett, Joyner y Halenda). Las tres curvas de distribución muestran un comportamiento monomodal; sin embargo, la intensidad, la posición y la amplitud difieren ligeramente. Los valores promedio de tamaño de poro se muestran en la Tabla 2, y a pesar de ser valores muy cercanos, se observa que la curva de distribución del material Al1:3.5 exhibe una distribución más amplia y con mayor intensidad. Una diferencia más marcada puede observarse en el volumen de poro adsorbido, puesto que la muestra Al1:2.5 presenta un menor volumen, lo cual puede atribuirse a que las moléculas de gas se adhirieron débilmente a la superficie del material. Por otra parte, Rutkowska et al. (2021) sintetizaron NP de óxido de aluminio por el método de sol-gel modificado por Yoldas, donde observaron que, a partir del tri-sec-butóxido de aluminio obtuvieron una estructura mesoporosa con una isoterma tipo IV. Esta última se combinó con una histéresis de tipo H2 y una presión relativa de 0.4, lo que implicó la formación de mesoporos en la muestra. De ese modo, mediante el análisis por el método de BET (Brunauer-Emmett-Teller), determinaron que las NP de alúmina presentan un área específica de $238 \text{ m}^2/\text{g}$ y un volumen de



poro de $0.2 \text{ cm}^3/\text{g}$. Estos valores en las propiedades texturales son indicativos de un material mesoporoso. Con respecto a Dhainaut et al. (2016), estos obtuvieron NP de alúmina por el método de sol-gel, a partir del tri-sec-butóxido de aluminio y distintos ácidos nítrico, cloruro de hidrógeno y acetato de metilo (HNO_3 , HCl y $C_3H_6O_2$). De esa forma, para las tres muestras se obtuvieron isotermas de tipo IV con superficies de 287 a $328 \text{ m}^2/\text{g}$ y un volumen de poro de 0.7 a $1 \text{ cm}^3/\text{g}$. Los resultados mostraron que los ácidos HCl y $C_3H_6O_2$ formaron poros de mayor tamaño en comparación con el ácido HNO_3 .

Por otro lado, Bleta et al. (2012) sintetizaron alúmina mediante el método de sol-gel, utilizando tri-sec-butóxido de aluminio y el copolímero Pluronic F127. El objetivo fue estudiar cómo influye el copolímero en las propiedades estructurales de la alúmina resultante. Los resultados mostraron que la muestra exhibe una isoterma tipo IV con un bucle de histéresis tipo H1, lo cual es característico de un material mesoporoso. La adición del Pluronic indujo cambios notables en la textura de la alúmina, el volumen de poros específicamente aumentó de 0.31 a $0.52 \text{ cm}^3/\text{g}$, el tamaño de poros creció de 5 a 6 nm, y el área específica incrementó de 300 a $370 \text{ m}^2/\text{g}$. Estos resultados revelaron que la adición del copolímero Pluronic F127 en la síntesis de sol gel tuvo un impacto significativo en las propiedades estructurales finales de la alúmina. A partir de lo anterior, se puede concluir que los estudios revisados y los resultados obtenidos demuestran que la química en la síntesis y la rampa de calentamiento desempeñan un papel clave en las características texturales de las NP de alúmina, lo cual es decisivo para sus aplicaciones deseadas. Cabe señalar que, a pesar de no haber restos del aditivo glicerol en la alúmina, se sabe que éste también puede ser utilizado no solo como estabilizante, sino también para incrementar el área específica del material resultante.

5.5. Dispersión de luz dinámica (DLS)

La técnica de DLS es de utilidad para conocer el tamaño de las NP cuando éstas se encuentran en diferentes dispersantes, porque en la mayoría de sus aplicaciones se requiere suspenderlas en un medio y evidentemente, la

naturaleza de éste influye en la agregación, la precipitación o la estabilidad de las NP. La Figura 11 muestra las curvas de distribución de tamaño hidrodinámico de las muestras de Al_2O_3 sintetizadas.

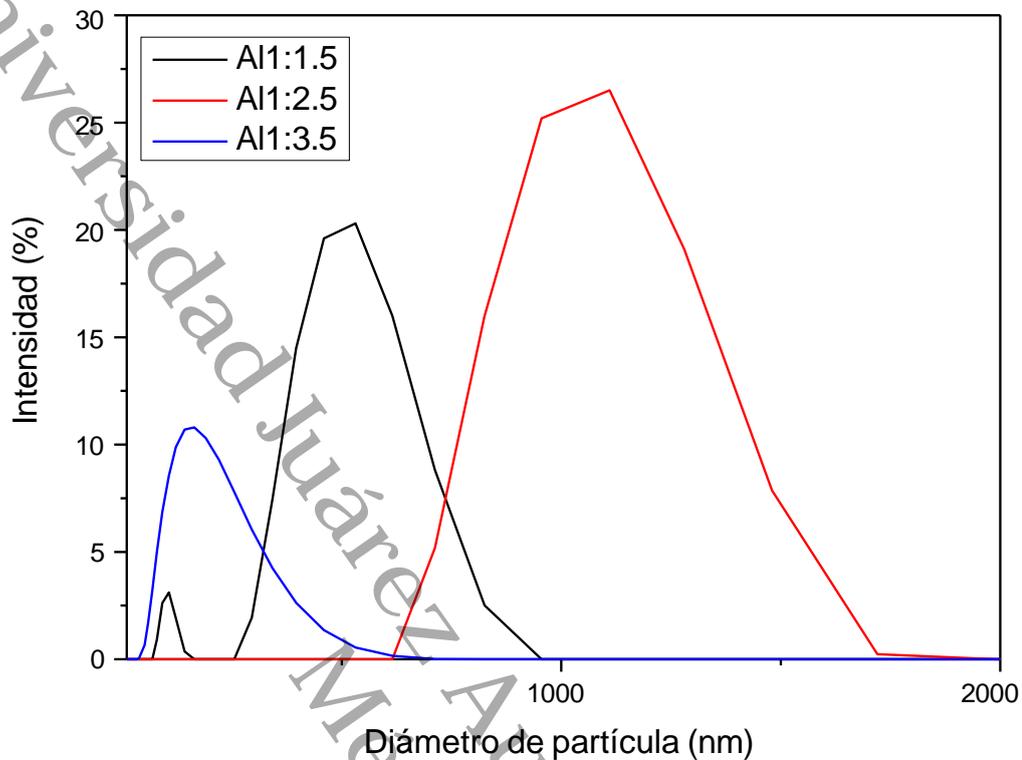


Figura 11.- Tamaño hidrodinámico de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares, de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5. Las mediciones se realizaron empleando agua como dispersante a temperatura ambiente

Los resultados de las curvas de distribución de tamaño hidrodinámico se muestran en la Figura 11. En ellas se observa que la distribución de la muestra Al1:1.5 tiene dos señales, mientras que las correspondientes a las muestras Al1:2.5 y Al1:3.5 presentan una sola señal con una distribución muy amplia. Los valores de Z_{avg} y sus respectivos índices de polidispersión (PDI) se muestran en la Tabla 3. De estos valores se puede decir que los materiales Al1:1.5 y Al1:2.5 presentan polidispersión, siendo el material Al1:3.5 el que exhibe un tamaño más uniforme en este dispersante. Esto puede contrastarse con los resultados obtenidos por microscopía electrónica, dado que para los materiales Al1:1.5 y Al1:3.5 se observan aglomerados de partículas individuales, sin embargo, estos aglomerados pueden separarse al sonicar la dispersión previamente a la medición de DLS, permitiendo medir los diámetros de las partículas más pequeñas. La muestra Al1:3.5 presenta un tamaño promedio aproximadamente

3.5 veces menor que la muestra Al1:1.5. Mientras que para la muestra Al1:2.5 en donde se observó la presencia de agregados (partículas más fuertemente unidas), estos no se pueden separar en sus partículas más pequeñas a pesar del pretratamiento por sonicado previo a la medición, debido a dos factores: el tamaño hidrodinámico de las NP y la tendencia a la aglomeración en condiciones acuosas, lo que explica las mediciones cercanas a $2\mu m$.

En un estudio realizado por Mehta et al. (2023) en el cual reportaron la síntesis de un nanofluido a partir de NP de Al_2O_3 comercial (Nanoshel, 20 nm), empleando CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) como estabilizante a largo plazo, acompañado de dos distintos tratamientos de sonicado (sonicado y ultrasonicado), ya que la alúmina sola tiende a sedimentarse en poco tiempo. En dicho estudio encontraron que el uso del CTAB acompañado de ultrasonicado, previene la aglomeración y mejora la estabilidad de las NP, ya que sin emplear el tratamiento y el tensioactivo se obtienen diámetros hidrodinámicos de 534 nm, que en comparación con los resultados del trabajo aquí presentado son mayores al Z_{avg} del material con el mayor contenido de agua (Al1:3.5), lo cual demuestra que la metodología empleada favorece la obtención de tamaños hidrodinámicos menores. Asimismo, Mahbulul et al. (2016) estudiaron la influencia del tiempo de ultrasonicación de las NP de Al_2O_3 comercial (Sigma-Aldrich, 13 nm) suspendidas en agua destilada y sometidas a un periodo de entre 0 y 5 h. Para el tiempo $t=0$ h, se reportaron tamaños de entre 92 y 300 nm, mientras que para el máximo tiempo de ultrasonicado ($t=5$) los tamaños fueron de 42 a 210 nm. Esto indica distribuciones muy amplias, las cuales muestran menos polidispersión cuando se ultrasónica por 2 h (119-150 nm).

Por otra parte, se ha reportado la interacción de NP de γ -alúmina comercial (Sigma-Aldrich, <50 nm) en distintos dispersantes (agua y soluciones 1 M de acetato de amonio, cloruro de sodio, acetato de bario y 0.3 M, de nitrato de bario) encontrando que, al usar dispersantes a base de soluciones de estas sales, se obtienen tamaños de entre 1 y cerca de $4\mu m$; mientras que, al emplear agua el tamaño medido es de casi 800 nm (Drecun et al., 2023). Lo que demuestra que el uso de NP de alúmina comercial se ve aún limitado por esta característica.



En otra investigación realizada por De et al. (2016) examinaron el comportamiento de NP de alúmina comercial (Sigma-Aldrich, 50 nm) en agua milliQ, variando la concentración en 1.25, 2.5 y 5 μM . Se observó que, a mayor concentración, mayor tamaño hidrodinámico (121 a 479 nm). En este sentido, en el presente trabajo se emplearon concentraciones mayores para la determinación (cerca de 4 mM), sin embargo, se obtuvieron distintos valores para este parámetro que se asocian más bien a los efectos de los parámetros de síntesis de la alúmina. Por su parte, Srikanth et al. (2015) evaluaron también la estabilidad de las NP de Al_2O_3 comercial (Sigma-Aldrich, <50nm), en dos dispersantes: agua milliQ y medio de cultivo celular, obteniendo tamaños de 303 a 512 nm al dispersar en agua; mientras que, a una concentración de 10 $\mu g/mL$ en el medio de cultivo, el tamaño aproximado fue de 42 nm, reportando que el tamaño de las NP de alúmina favorecía la aglomeración tanto en agua milliQ como en el medio de cultivo.

Adicionalmente, Benavides et al. (2016) reportaron el efecto del uso de agua milliQ y agua de grifo en el tamaño de NP comerciales de Al_2O_3 (20 nm) en suspensión (Alfa Aesar), exhibiendo tamaños de 192 y 187 nm, respectivamente. Donde se observa que también este tipo de NP tiende a aglomerarse en agua lo que se refleja en tamaños hidrodinámicos cerca de 9 veces mayor al tamaño medido por microscopía. Este comportamiento reportado, es similar a lo observado en el presente trabajo aún y cuando la diferencia de presentación (polvo y suspensión), ya que para el material Al1:3.5 el tamaño hidrodinámico se encontró cerca de 145 nm en comparación con los tamaños de partícula de cerca de 25 nm observados por microscopía. Los resultados de estos estudios han demostrado que las NP de alúmina presentan, por general, una desventaja: la fácil aglomeración en dispersantes acuosos, que generalmente requieren del uso de aditivos para prevenir la aglomeración. Sin embargo, esto puede modificarse por medio de las estrategias adecuadas desde el proceso de síntesis.

5.6. Dispersión de luz electroforética (ELS)

La estabilidad de las NP en suspensiones es muy importante, porque esto puede determinar las interacciones que pueden tener con los medios biológicos. La

estabilidad de partículas en suspensiones coloidales se define como la capacidad que tienen éstas de permanecer suspendidas. En este sentido, el valor de potencial zeta es un indicador que se ha utilizado como criterio de estabilidad para estas suspensiones. Es importante mejorar la estabilidad de las NP en medios acuosos, que suele ser una de las principales limitantes para sus aplicaciones a gran escala. Los resultados de esta técnica de caracterización por ELS se encuentran en la Tabla 3, donde se observan los valores de potencial zeta cuando las NP se dispersan en agua. Además, se encontró que, a menor contenido de agua durante la síntesis, el valor del potencial zeta es más electropositivo debido a la mayor concentración de iones, cambios en la hidratación de la superficie y posibles variaciones en el pH, aunque en general los valores obtenidos se asocian con una escasa o nula estabilidad de la suspensión por estar en el rango ± 30 mV. Es así como se puede obtener el valor más bajo para la muestra Al1:3.5, la cual, de acuerdo con la literatura, se puede catalogar como de rápida floculación (Kucera, 2022).

Dado que los experimentos para la evaluación de la toxicidad de las NP aquí reportadas se evaluaron en una especie marina, se determinó también el potencial zeta de las muestras gracias a la solución salina (3.5 %m/v) como medio dispersante. En este caso, se observó que la naturaleza del dispersante (potencial zeta electronegativo) también ejerce un efecto en los valores de potencial zeta de las NP, por lo que todas obtienen un valor electronegativo de entre -14 y -18 mV, pero sin una correlación entre este valor y la relación alcóxido:agua.

Tabla 3.- Valores de DLS y ELS de las NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método de sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares, tri-sec-butóxido de aluminio:agua (Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5). Las mediciones se realizaron empleando agua y solución salina al 3 %m/v como dispersante a temperatura ambiente

Muestra	Z-average (nm)	PDI (índice de polidispersión)	Potencial zeta (mV) en agua	Potencial zeta (mV) en 3% NaCl
Al1:1.5	515	0.540	12.9	-18.30
Al1:2.5	1743	0.600	9.24	-13.75
Al1:3.5	145	0.200	-5.27	-14.3



Gouvea y Murad (2001) analizaron el efecto de dispersantes comerciales (sal de amonio de un polielectrolito a un pH 7 y sal de amonio de copolímero acrílico a un pH 3) en los valores de potencial zeta durante la preparación de suspensiones de SnO_2 a pH 11 y Al_2O_3 a pH 2 comerciales (tamaño no reportado), donde se exhibieron valores de potencial zeta de $\zeta = -39$ mV para SnO_2 y $\zeta = +34$ mV para Al_2O_3 , al asumir una estrecha relación entre el pH de la medición y el valor de este parámetro, más que con el óxido empleado.

Por otra parte, De et al. (2016) evaluaron las cargas iónicas de NP de alúmina comercial y óxido de aluminio a granel (<50 nm), utilizando como dispersante agua milliQ a un pH 7, lo que exhibió valores -15.9 mV a -16.9 mV para las NP de Al_2O_3 . Del mismo modo, para el material a granel, las NP fueron suspendidas en agua biodestilada a un pH 6, con lo que se obtuvieron partículas con PDI bajo. En el caso de Srikanth et al. (2015), evaluaron la estabilidad de NP de Al_2O_3 comercial (Sigma-Aldrich) inferiores a 50 nm, empleando como dispersante agua milliQ, con lo que obtuvieron valores de $\zeta = +12.4$ mV; y en el medio de cultivo celular este valor fue de $\zeta = -30.3$ mV. Ellos reportaron que el pH tiene un impacto sobre el valor del potencial.

Adicionalmente Benavides et al. (2016) evaluaron el efecto de dos tipos de dispersantes: agua milliQ y agua de grifo, para NP de alúmina comercial en suspensión (Alfa Aesar, 20nm) y ZnO (50 nm), exhibiendo valores de $\zeta = +29.8$ mV y $\zeta = -5.3$ mV para Al_2O_3 y $\zeta = -23.1$ mV y $\zeta = -5.1$ mV para ZnO. Estos resultados mostraron variaciones significativas debido a la presencia de iones en el agua de grifo, los cuales pueden promover procesos de agregación. Con base en lo anterior, se puede argumentar que mayormente las NP de Al_2O_3 exhiben valores de potencial zeta electronegativo desde valores de -5mV hasta alrededor de -30mV, resultados que contrastan con los obtenidos en esta investigación. En suma, se puede afirmar que la relación más baja alcóxido:agua se obtuvieron valores electropositivos que coinciden cuando la relación de agua aumenta.

5.7. Ensayos de toxicidad en *Artemia salina*

La evaluación de la exposición aguda es ampliamente usada para detectar los efectos tóxicos inmediatos que puede causar un nanomaterial, así como para comprender los posibles mecanismos biológicos involucrados. A una gran variedad de nanomateriales se le ha determinado la CL_{50} y CL_{90} en el modelo de *Artemia salina*. No obstante, pocos son los estudios que han abordado la toxicidad de las NP de Al_2O_3 , a pesar su gran diversidad de usos. En este trabajo se expuso durante 48 h a nauplios de *A. salina* recién eclosionados. Al finalizar el tiempo de exposición con las diferentes NP sintetizadas, se realizaron observaciones al microscopio óptico para determinar daño o alteraciones de los nauplios y se contrastaron contra los nauplios sin la exposición a NP (control).

Como se puede ver claramente en la Figura 12 los nauplios en contacto con las NP $Al1:1.5$ y $Al1:2.5$ (Figura 12, a-j) muestran una acumulación de las NP en el intestino de los nauplios. Observándose un incremento gradual con una relación directa a la concentración de NP administradas. Además, en los nauplios expuestos a las concentración más altas de las NP, se observó además de una mayor acumulación, fuertes alteraciones morfológicas con evidente degradación del tejido de los organismos. En contraste, en los nauplios expuestos a las NP de $Al1:3.5$ (Figura 12, k-o), una menor acumulación. Fueron observadas en comparación con las otras NP, además no se observaron signos de alteración o daño morfológicos en los organismos, con una apariencia casi similar a los nauplios sin exposición a las NP (Figura 12, p), donde se observaron las estructura de la región bucal e intestino sin alteraciones.

En los organismos expuestos a las distintas concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ (Figura 12, q-r) mostraron claras y fuertes alteraciones morfológicas, como hinchazón y degradación del tejido en todo el cuerpo, así como una mayor pigmentación.

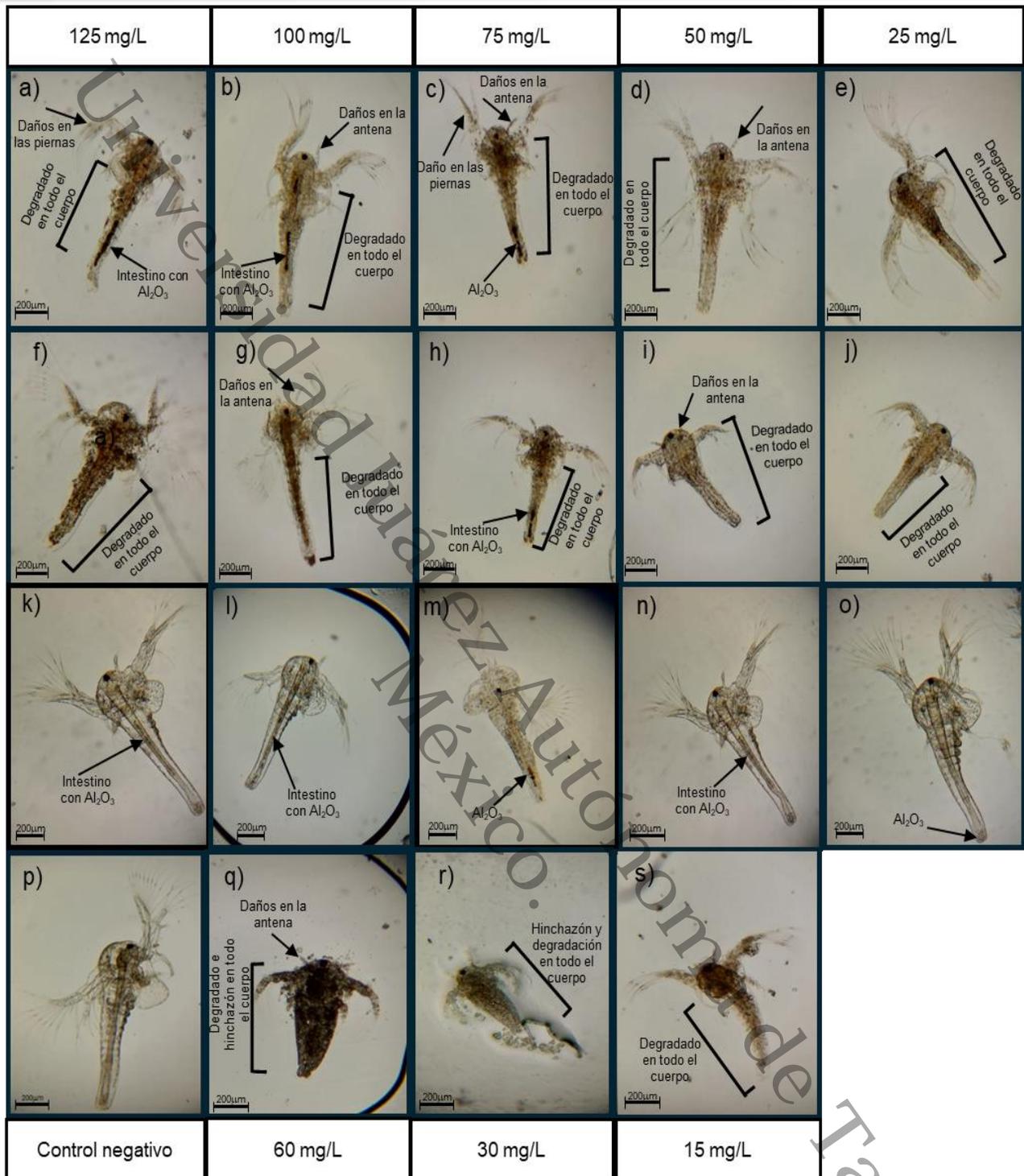


Figura 12. Observación de nauplios de *Artemia salina* bajo un microscopio óptico, tras 48 h de exposición a nanopartículas de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua de a) - e) $Al1:1.5$, f) - j) $Al1:2.5$ y k) - o) $Al1:3.5$, a concentraciones de 125 mg/L a 25 mg/L. Se incluyeron el control negativo (p) y el control positivo utilizando $K_2Cr_2O_7$ a concentraciones de 60 mg/L a 15 mg/L

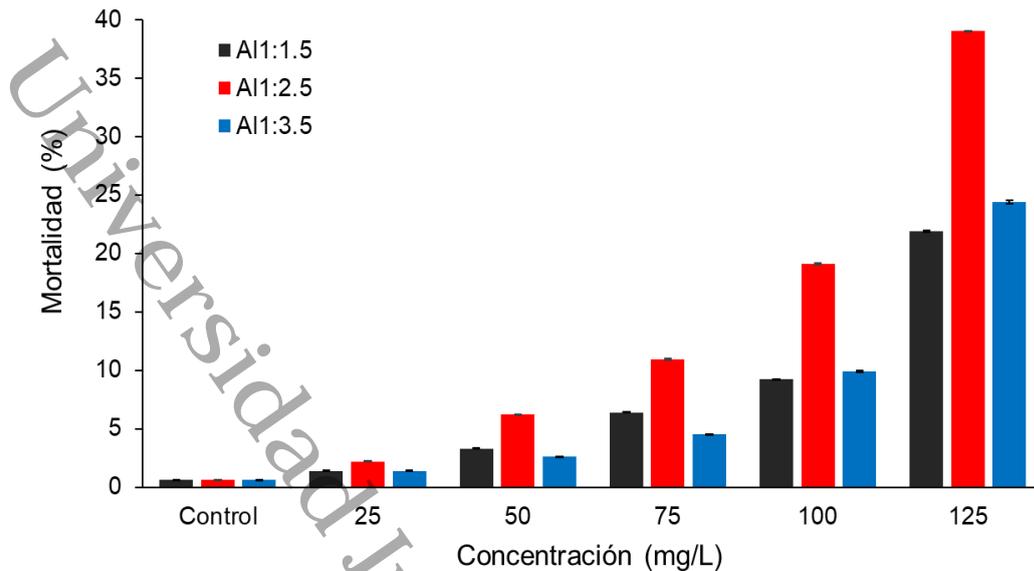


Figura 13.- Porcentaje de mortalidad en nauplios de *Artemia salina* tras 48 h de exposición a nanopartículas de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5

El porcentaje de mortalidad de los nauplios de *Artemia salina* se calcularon utilizando la fórmula de Abbott (Delgado, 2014) después de las 48 h de exposición a las distintas concentraciones de las diferentes síntesis de óxido de aluminio. En general, se observaron un bajo porcentaje de mortalidad en las tres síntesis, incluso a la concentración más alta evaluada (125 mg/L). Sin embargo, la síntesis Al1:2.5 presento una excepción notable, ya que mostró el mayor porcentaje de mortalidad (39%) únicamente a esta concentración, como se ilustra en la Figura 13. Este fenómeno puede atribuirse a través de la interacción entre el tamaño hidrodinámico y la aglomeración de las NP de Al1.2.5 en condiciones de aguas salinas.

Con los datos obtenidos, se calculó la concentración letal media (CL_{50}), en general se observó que los valores obtenidos, son muy cercanos entre sí, siendo la síntesis con menor toxicidad la NP Al1:1.5, con un CL_{50} de 185.8 mg/L, seguida de la Al1:3.5, el CL_{50} con 174.6 mg/L y la síntesis Al1:2.5, con un valor CL_{50} fue de 144.9 mg/L (Tabla 4). Sin diferencia estadísticamente significativas entre ellas ($p > 0.05$).

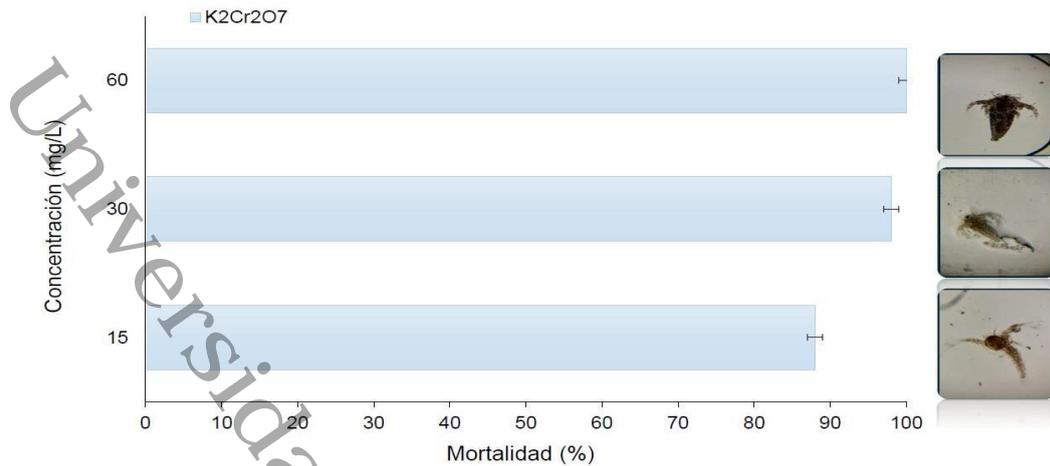


Figura 14.- Porcentaje de mortalidad en nauplios de *A. salina* tras 48 h de exposición con $K_2Cr_2O_7$ a concentraciones de 15, 30 y 60 mg/L

Con respecto al control positivo ($K_2Cr_2O_7$) en la Figura 14, se muestra que a medida que la concentración del dicromato de potasio aumentaba, se registró un mayor porcentaje de mortalidad en los nauplios de *Artemia*, se registraron con un comportamiento típico de dosis respuestas, con una mortalidad del 100% a la concentración de 60 mg/L, con una CL_{50} muy baja de 9.9 mg/L (Tabla 4). Los resultados obtenidos del control positivo ($K_2Cr_2O_7$), usado como tóxico de referencia (Centro de Calidad Ambiental, 1995), son similares a CL_{50} que oscilan entre los 9.1 mg/L (Ocaranza et al. 2019), y 12 mg/L (Salazar et al. 2022), previamente reportados en ensayos agudos en nauplios de *Artemia* tras una exposición de 48 h. En consecuencia, estos datos corroboran la coherencia y consistencia de los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 4.- Concentración letal media (CL_{50}) de NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5, Al1:3.5 y $K_2Cr_2O_7$, en nauplios de *Artemia salina*

Nanopartículas	CL_{50} (mg/L)
Al1:1.5	185.85
Al1:2.5	144.95
Al1:3.5	174.65
$K_2Cr_2O_7$	9.98

Por otra parte, se analizó el daño celular utilizando la tinción con naranja de acridina y observación mediante microscopio óptico de epifluorescencia. Este colorante se caracteriza por su intensa emisión de fluorescencia, lo que permite identificar células muertas o con daño en la membrana citoplasmática, ya que se une al ADN y genera una fluorescencia verde intensa, acumulándose en el interior celular. En contraste, en células vivas o en las etapas tempranas de la apoptosis, el colorante se intercala en el ADN y emite una fluorescencia verde leve u opaca, lo que indica la integridad de la membrana (Arulvasu et al., 2014; Damas et al., 2019). En la Figura 15 se observaron las diferencias en la intensidad de la fluorescencia emitida en respuesta a la exposición a las diferentes síntesis de Al_2O_3 , así como de los controles negativo (sin NP) y positivo ($K_2Cr_2O_7$). En el control negativo (Figura 15, a) se observaron una baja emisión de fluorescencia, indicativo de que las células no presentan daño alguno. En contraste, en las muestras expuestas a las concentraciones más altas de NP (125 mg/L) de los nanomateriales Al1:1.5 y Al1:2.5 (Figura 15, b y c), se apreciaron puntos de fluorescencia intensos, los que sugiere que los nauplios de *Artemia* presentaron daño celular en la membrana citoplasmática. En contraste, a la misma dosis de la muestra Al1:3.5 (Figura 15, d), no se observaron zonas intensas de fluorescencia, lo que indica que los nauplios de *A. salina* no presentaban daño celular. Este comportamiento puede atribuirse a diferencias en el potencial zeta, ya que valores cercanos a cero promueve menor interacción con las barreras fisiológicas.

Se ha reportado que las NP catiónicas pueden tener una mayor toxicidad que las aniónicas, debido a que son más fácilmente incorporadas por las células (Weiss et al., 2021). Además, se ha observado que las NP hidrofóbicas y con cargas positivas, como las de SiO_2 causan menor citotoxicidad (Shahbazi et al., 2013). En los nauplios expuestos a concentraciones 15 y 30 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ (Figura 15, f y g), se observó la presencia de puntos más intensos de fluorescencia, lo que sugiere daño celular en los organismos. A la concentración más 60 mg/L de $K_2Cr_2O_7$, se observó una fluorescencia verde intensa generalizada en todo el cuerpo del nauplio, señalando un fuerte daño celular generalizado, probablemente debido a la inducción de apoptosis.

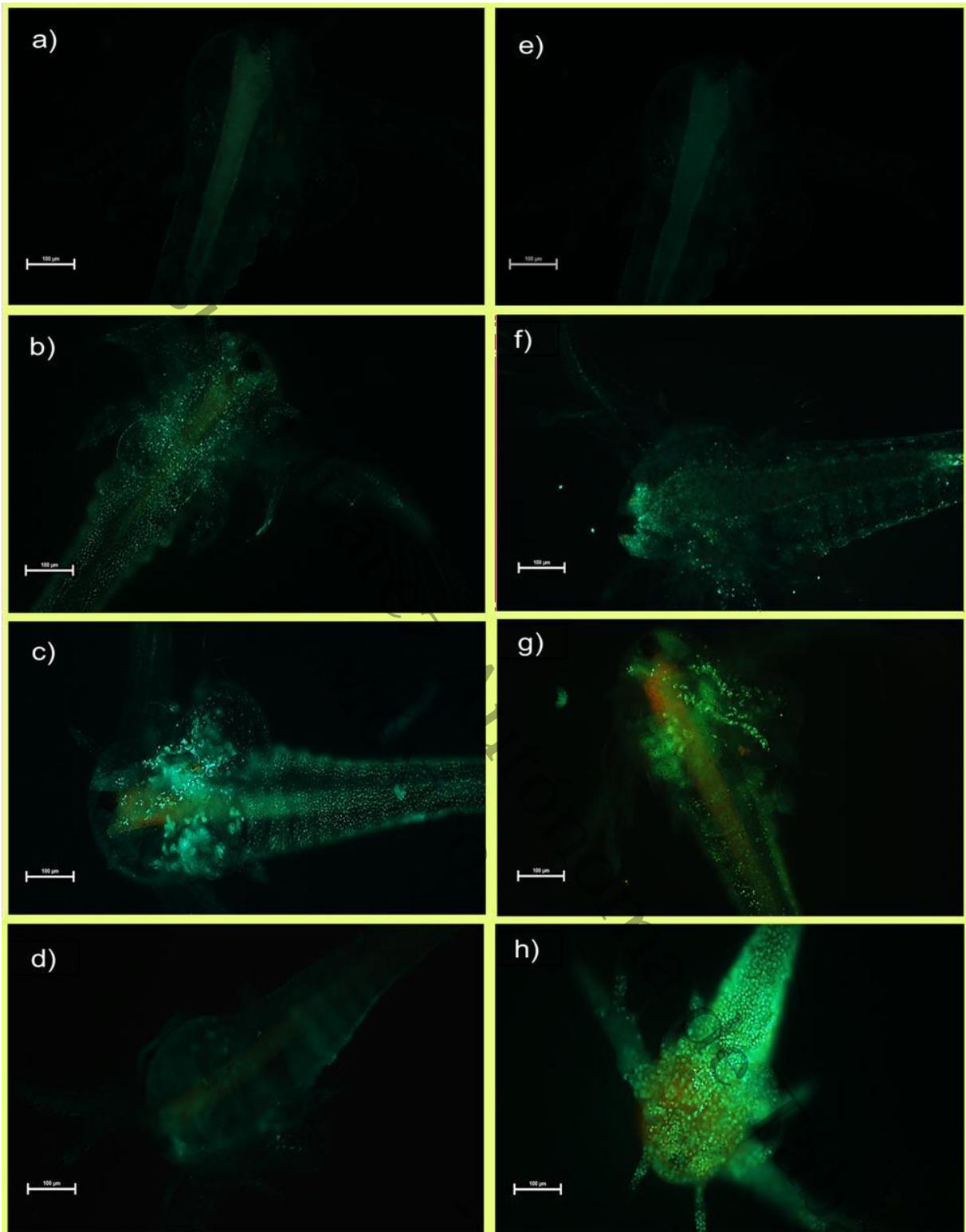


Figura 15.- Nauplios de *Artemia salina* observados en el microscopio óptico de epifluorescencia tras 48 h de exposición a 125 mg/L de NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua y teñidas con naranja de acridina. (a) Control negativo, (b) Al1:1.5, (c) Al1:2.5, (d) Al1:3.5 y control positivo con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a diferentes concentraciones (e) 15 mg/L, (f) 30 mg/L y (g) 60 mg/L



En este trabajo, se observó que el nivel de toxicidad de las NP de alúmina está fuertemente relacionado por sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, la morfología, y la fase cristalina, lo cual concuerda diversos reportes en la literatura. Se ha documentado que las NP de $\gamma-Al_2O_3$ de tamaño pequeños de 5 nm, presentaron una toxicidad significativamente mayor en comparación con partículas más grandes, debido a su mayor superficie específica y reactividad, lo cual fue evidente en una mayor mortalidad de *Artemia salina* a concentraciones de 100 mg/L (Ates et al., 2015). Estos resultados coinciden con los resultados de esta investigación, donde las NP más pequeñas mostraron una toxicidad más pronunciada en los nauplios de *Artemia salina*.

Asimismo, la incorporación de metales como el níquel en la estructura de las NP también provocan una mayor toxicidad en contraste con NP de alúmina pura (Svartz et al. 2017), debido a que un potencial zeta más electropositivo favorece la interacción con las membranas celulares y en consecuencia alteran fuertemente la morfologías de la *Artemia salina*, tales como el agrandamiento de los intestinos y la pérdida de antenas (Özkan et al., 2016). En contraste, NP obtenidas en este estudio presentaron un potencial zeta electronegativo en condiciones de salinidad (Tabla 3), lo que podría explicar su menor interacción con las barreras fisiológicas de los organismos y, en consecuencia, su menor toxicidad en comparación con las NP con cargas positivas, y porque no hay diferencia significativa entre las síntesis. La presencia de metales hace evidente de que no solo el tamaño y la carga son importantes, sino también la composición química y la posible liberación de iones metálicos tóxicos en el medio.

Además, los resultados de esta investigación reflejan que la fase cristalina de las nanopartículas también es fundamental en su efecto tóxico. En concordancia con lo previamente reportado por Nogueira et al. (2020), observaron que las NP en fase η presentaron una toxicidad más elevada a bajas concentraciones que las NP en fase α , debido a una mayor tendencia a acumularse en el intestino de los nauplios expuestos. Esta correlación entre fase cristalina de los NP y la toxicidad deja claro, la importancia de la caracterizar adecuadamente las NP antes de su aplicación potencial en los sistemas biológicos.

Otros estudios también sugieren que el tamaño y la tendencia a la agregación de las NP está relacionada con su toxicidad. Las NP de TiO_2 , que suelen formar agregados micrométricos, y suelen ser menos tóxicas en su forma de menor tamaño en comparación con NP más grandes, acentuando que factores como la carga superficial y la composición química también son puntos críticos para la ecotoxicidad (Gosteva et al., 2015). Estos resultados son similares a los datos de esta investigación, donde las diferencias en tamaño y estabilidad coloidal de las NP de alúmina sugieren su efectos tóxicos en *Artemia salina* y *Eisenia foetida*.

5.8. Ensayos de toxicidad en *Eisenia foetida*

Las lombrices de tierra, especialmente *Eisenia foetida*, son utilizadas como indicadores de toxicidad debido a su susceptibilidad a los contaminantes presentes en el suelo. En este estudio, se evaluaron diversos parámetros tras la exposición aguda a NP de Al_2O_3 , incluyendo la coloración y el comportamiento de las lombrices, para determinar el impacto de estas NP en su salud.

En la Figura 16 se muestran las lombrices expuestas a las distintas síntesis de NP a la concentración más alta (1000 mg/kg), junto con sus respectivos controles. En el control negativo (Figura 16, a y e), las lombrices se observaron sanas, sin daños morfológicos y con una coloración rojiza típica de organismos no estresados. En contraste, en las síntesis Al1:1.5 (b), Al1:2.5 (c), y Al1:3.5 (d), las lombrices expuestas a 1000 mg/kg mostraron cambios notables, como una coloración rojiza oscura y una textura seca al tacto, movimientos más lentos y una respuesta reducida a los estímulos en comparación con las del control negativo, indicando una posible respuesta de estrés.

Particularmente, las lombrices expuestas a la síntesis de NP con mayor proporción de agua (Al1:3.5) mantuvieron una coloración rojiza y una textura mucosa incluso a la concentración más alta, mostrando movimientos y respuestas a estímulos comparables a las del control, lo que sugiere un bajo impacto tóxico de esta síntesis en comparación con las demás.



En el control positivo con cloroacetamida a concentraciones de 14.4 mg/kg (Figura 16, f), 28.8 mg/kg (Figura 16, g), y 57.7 mg/kg (Figura 16, h), se observaron signos evidentes de toxicidad. Las lombrices presentaron piel áspera, signos de irritación y una coloración grisácea. Sus movimientos eran aletargados y erráticos, y con una respuesta a los estímulos significativamente reducida. Otro parámetro importante observado fue el líquido celómico, un fluido de color amarillo que estos especímenes expulsan como un indicativo de estrés, especialmente en presencia de signos de daño o inflamación en la piel. Aunque no existe un valor universal para determinar cuándo la cantidad de líquido celómico es suficiente, se considera que un aumento significativo en su producción es un indicativo de estrés. Este aumento se detectó únicamente en las lombrices expuestas a la síntesis Al1:1.5 a la concentración más alta (1000 mg/kg). Este fenómeno puede atribuirse al tamaño hidrodinámico y al área específica de las NP de Al1:1.5, lo que facilita su interacción con los tejidos de las lombrices, provocando una respuesta fisiológica que resulta en la expulsión de líquido celómico. En contraste, en las síntesis Al1:2.5 y Al1:3.5, no se observó tal producción, lo que sugiere que estas condiciones no generaron un nivel de estrés suficiente para desencadenar esta respuesta. En el control positivo, la producción de líquido celómico fue evidente, asociándose con un elevado nivel de estrés en los organismos (De Paiva et al., 2023).



Figura 16.- Lombrices californianas sometidas a NP de Al_2O_3 sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua 1:1.5 (b), 1:2.5 (c) y 1:3.5 (d), expuestas por 14 días de exposición a concentraciones de 1000 mg/kg. Se incluyeron el control negativo (a y e) y el control positivo utilizando cloroacetamida a concentraciones de 14.4 (f), 28.8 (g) y 57.7 mg/kg (h)

Respecto a la mortalidad, no se registró ninguna de las lombrices muertas después de la exposición de 14 días a las diferentes síntesis y las distintas concentraciones de las NP de Al_2O_3 , incluso a la concentración más alta de 1000 mg/kg. Sin embargo, en el control positivo con $ClCH_2CONH_2$, se observaron una respuesta dosis respuesta de mortalidad con el aumento de la concentración, alcanzando un 100 % de mortalidad a 57 mg/kg (Figura 17), incluso antes de finalizar el tiempo del ensayo.

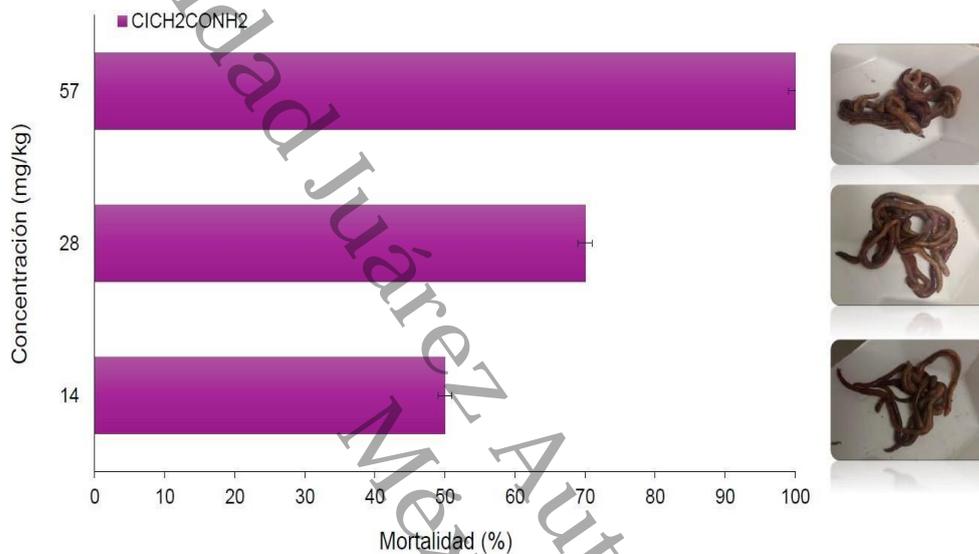


Figura 17.- Porcentaje de mortalidad en *Eisenia foetida* tras 14 días de exposición con $ClCH_2CONH_2$ a concentraciones de 14, 28 y 57 mg/kg

En la Figura 18 se muestra la pérdida de peso en *Eisenia foetida* tras la exposición a nanopartículas de Al_2O_3 con distintas relaciones molares. Se observó que en las síntesis $Al1:1.5$ y $Al1:2.5$, la pérdida de peso en las lombrices fue más pronunciada a medida que aumentaba la concentración de las nanopartículas, lo que indicaba que la exposición a concentraciones más altas tiene un impacto negativo en la salud de los organismos. El análisis estadístico confirmó que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$), entre los tratamientos a medida que aumentan las concentraciones de las NP $Al1:1.5$ y $Al1:2.5$. Conforme la concentración aumentada las diferencias en la pérdida de peso son más evidentes. Las NP de $Al1:1.5$ mostraron un efecto mayor en las lombrices, con una pérdida de peso hasta del 30%.

Por otro lado, la síntesis con mayor proporción de agua, $Al1:3.5$, mostró una pérdida de peso mínima, incluso a la concentración más alta evaluada de 1000

mg/kg, sugiriendo que esta formulación tiene un menor efecto tóxico. En comparación, el control positivo con cloroacetamida mostró una pérdida de peso estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), a medida que la concentración aumentaba, evidenciando el fuerte efecto tóxico de este compuesto, en las concentraciones de 14.4, 28.8, y 57.7 mg/kg.

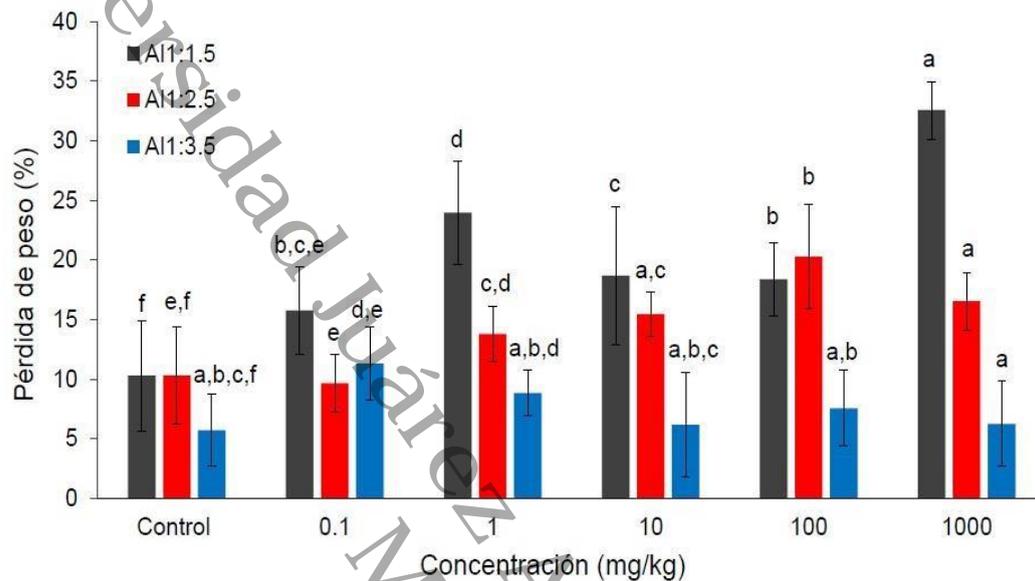


Figura 18.- Pérdida de peso en *Eisenia foetida* tras 14 días de exposición a NP de Al_2O_3 , sintetizadas, obtenidas por el método sol-gel modificado por Yoldas con distintas relaciones molares de tri-sec-butóxido de aluminio:agua Al1:1.5, Al1:2.5 y Al1:3.5 * Letras iguales no hay diferencias significativas entre las concentraciones de cada tratamiento

En estudios previos, se ha evaluado la toxicidad de nanopartículas de alúmina en *Eisenia foetida* con resultados que sugieren efectos no letales. Coleman et al. (2010) examinaron la alúmina comercial de 11 nm (Sigma-Aldrich) en concentraciones de 100, 300, 1000, 3000 y 10,000 mg/kg bajo pruebas agudas y no encontraron mortalidad en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, las concentraciones superiores a 3000 mg/kg afectaron significativamente la reproducción de capullos en las lombrices, lo que limita el uso de estas NP en aplicaciones ambientales debido a su impacto negativo en la reproducción de los organismos.

Por otro lado, Yausheva et al. (2017) compararon los efectos de NP de alúmina obtenidas mediante explosión eléctrica de un conductor en atmósfera de argón (54 nm, con un potencial zeta de 30 ± 0.1 mV) sobre la microflora del suelo y el intestino de *E. foetida*. En este estudio, las lombrices fueron expuestas a



concentraciones de 50, 100, 300 y 3000 mg/kg. Los resultados mostraron una disminución progresiva de la microflora intestinal y del suelo a medida que aumentaba la concentración, con reducciones en el número de microorganismos que oscilaron entre un 9.2 % y un 43.2 %. Además, se reportó una mortalidad del 20 % en la concentración más alta de 3000 mg/kg. Estos hallazgos indican que la toxicidad de las nanopartículas de alúmina depende no solo de la concentración, sino también de sus características fisicoquímicas, como el tamaño y el potencial zeta. En ambos estudios subrayan la importancia de realizar evaluaciones exhaustivas de los riesgos biológicos asociados con las nanopartículas de alúmina y otros nanomateriales metálicos, ya que su impacto sobre la salud de los organismos y el ecosistema aún presenta muchas limitaciones y riesgos potenciales que requieren un análisis más integral.

Sin embargo, en el estudio de Piotrowska et al. (2021), se evaluó el efecto de las NP comerciales Al_2O_3 (<50 nm) y micropartículas Al_2O_3 (<10 μm) obtenidas de Sigma-Aldrich, en la especie *Eisenia*. Estas lombrices fueron expuestas a condiciones agudas. Los resultados de esta investigación indicaron que las nanopartículas de alúmina, en forma nano y micro no se acumularon de manera significativa en los tejidos de estos organismos. Esto sugieren que las lombrices pueden moderar las consecuencias del aumento en la concentración de las NP en el suelo, lo que podría mitigar los efectos negativos asociados con estos materiales, particularmente, considerando el creciente uso y la rápida dispersión de las NP en el ambiente. Por lo que enfatizan la necesidad de caracterizar las NP con mayor detalle a través de pruebas ecotoxicológicas, ya que el suelo es probable que se presenten en forma de aglomerados. Esta interacción de los nanomateriales con el suelo y la actividad de las lombrices pueden afectar la biodisponibilidad y potencialmente su ecotoxicidad.

Los resultados indican que, aunque existen estudios previos sobre el uso de *Eisenia foetida* como modelo de toxicidad, las nanopartículas de Al_2O_3 exhiben efectos variados. Estos efectos dependen de múltiples factores como el método de obtención de las NP y sus características específicas. Esta variabilidad subraya la necesidad de una evaluación más detallada para comprender plenamente el impacto de estos nanomateriales en la toxicidad en el ambiente.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Capítulo VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

La modificación en la relación agua-alcóxido durante la síntesis por sol-gel mediante el método de Yoldas, permitió la obtención de NP de alúmina en la fase γ (gamma), con formas semi-esféricas, con tamaños inferiores a 100 nm y con estabilidad coloidal controlada, favoreciéndose una baja toxicidad en los dos modelos de estudio de *Artemia salina* y *Eisenia foetida* bajo condiciones de exposición agudas.

La adición de agua en las diferentes síntesis del óxido de aluminio también se evidencio a nivel molecular mediante el desplazamiento de las bandas espectrales, confirmado por FT-IR. Estos desplazamientos en las bandas características de Al_2O_3 probablemente se deben a las vibraciones asociadas de los grupos O-H.

Sin embargo, a pesar de la variación en la cantidad de agua utilizada durante la síntesis, los tres nanomateriales presentaron una fase cristalina gamma (γ). Esto sugiere que las condiciones de síntesis empleadas en este estudio no propiciaron la formación de otras fases, manteniendo un arreglo cristalino cúbico. Además, se observó que la forma y la intensidad de los picos en los patrones de difracción de rayos X proporcionaron información sobre la estabilidad de la estructura cristalina.

Al incorporar una mayor cantidad de agua en la síntesis de alúmina, se observaron cambios significativos en las propiedades estructurales de los nanomateriales. En particular, se registró un aumento notable en el área BET en la muestra Al1:1.5. La distribución de poro de las tres muestras mostró un comportamiento monomodal; no obstante, se observaron ligeras diferencias en la intensidad, posición y amplitud de las curvas. Los tres materiales presentaron isothermas de adsorción-desorción del tipo IV(a), con histéresis de tipo H2(b), lo que es característico de materiales mesoporosos. Además, los valores de dimensión fractal indicaron que las muestras eran similares en cuanto a la rugosidad superficial. Estos resultados se atribuyeron al efecto de la interacción superficial



Los resultados de este trabajo indican que las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de alúmina, como el tamaño, la morfología, la carga superficial y la fase cristalina, juegan un papel crucial en su toxicidad en los modelos *in vivo* de *Eisenia foetida* y *Artemia salina*. Las nanopartículas más pequeñas y con potencial zeta positivo mostraron una mayor toxicidad, afectando tanto la supervivencia como el comportamiento de los organismos.

Se observaron algunos efectos, pero sin muerte de las *E. foetida* expuestas a altas concentraciones de nanopartículas de alúmina, incluyendo pérdida de peso, cambios en la textura y coloración de la piel, y una reducción en la respuesta a estímulos. Estos efectos fueron más pronunciados en las síntesis con menor proporción de agua, lo que destaca la importancia de optimizar las condiciones de síntesis para minimizar los impactos negativos en organismos del suelo. En *Artemia salina*, las NP de alúmina también mostraron efectos con baja mortalidad, incluyendo alteraciones morfológicas como la acumulación de nanopartículas en el intestino y cambios en el comportamiento.

Se observó que las NP más pequeñas y con carga positiva inducían un mayor daño celular, mientras que las nanopartículas de Al1:3.5, que presentaban una mayor proporción de agua y carga negativa, mostraron un impacto tóxico significativamente menor, lo que refuerza la importancia de las condiciones de síntesis en la mitigación de la toxicidad de los nanomateriales.



6.2. Recomendaciones

Los estudios sobre la toxicidad de las NP de óxido de aluminio son aún limitados, ya que la mayoría de la investigación en ecotoxicidad se ha centrado en otros nanomateriales, dejando un vacío significativo en el análisis de la alúmina, especialmente la alúmina sintetizada mediante el método sol-gel. Por esta razón, es fundamental llevar a cabo más pruebas de ecotoxicidad de estos nanomateriales en modelos *in vivo* para comprender mejor sus efectos a largo plazo, incluyendo posibles cambios en el comportamiento y la reproducción, entre otros. Además, es crucial realizar una caracterización detallada de las NP en términos de tamaño, morfología y área superficial. Igualmente, es importante diversificar los modelos biológicos, incluyendo tanto especies marinas como terrestres, para obtener una comprensión integral del impacto de estos nanomateriales en el medio ambiente. En futuras investigaciones, se podrían incorporar estudios de exposición crónica y evaluaciones multiespecie para recopilar datos que ayuden a llenar los vacíos en el conocimiento sobre los impactos a largo plazo de las NP de alúmina y su posible bioacumulación en diferentes niveles de la red trófica.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

REFERENCIAS CITADAS

7.1 Referencias citadas

- AAT Bioquest. (s.f.). *LC50 Calculator*. AAT Bioquest: <https://www.aatbio.com/tools/lc50-calculator>
- Adam, P., Horváth, M., & Sinkó, K. (2023). Sol-gel derived porous aluminum oxide cryogel. Fiber composite systems. *Journal of Molecular Liquids*, 380, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121755>
- Aguado, J., Escola, J., Castro, M., & Paredes, B. (2005). Sol-gel synthesis of mesostructured γ -alumina templated by cationic surfactants. *Microporous and Mesoporous Materials*, 83(1-3), 181-192. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2005.03.021>
- Ahmadi, M., & Siadati, M. (2018). Synthesis, mechanical properties and wear behavior of hybrid Al/(TiO₂ + CuO) nanocomposites. *Journal of Alloys and Compounds*, 769, 713-724. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.07.363>
- Alabada, R., Kadhim, M., Abbas, Z., Rheima, A., Altimari, U., Dawood, A., Kianfar, E. (2023). Investigation of effective parameters in the production of alumina gel through the sol-gel method. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 8, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2023.100405>
- Alghriany, A., Omar, H., Mahmoud, A., & Atia, M. (2022). Assessment of the toxicity of aluminum oxide and its nanoparticles in the bone marrow and liver of male mice: ameliorative efficacy of curcumin nanoparticles. *ACS, Omega*, 7, 13841-13852. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsomega.2c00195>
- Amer, A., El-Didamony, H., El-Sokkary, T., & Wahdan, M. (2022). Synthesis and characterization of some calcium aluminate phases from nano-size starting materials. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 61(2), 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2020.07.006>
- Anna, P., Jana, V., Milan, P., Peter, Š., František, Š., Aydar, R., Dušan, G. (2023). Structure, thermal properties and crystallization behavior of binary $\text{Y}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3$ glasses with high alumina content. *Journal of Materials Research and Technology*, 26, 2333-2351. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.08.067>
- Anand, A. S., Gahlot, U., Prasad, D. N., Amitabh, & Kohli, E. (2019). Aluminum oxide nanoparticles mediated toxicity, loss of appendages in progeny of *Drosophila melanogaster* on chronic exposure. *Nanotoxicology*, 13(7), 977-989. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1602680>



- Arulvasu, C., Jennifer, S., Prabhu, D., & Chandhirasekar, D. (2014). Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp artemia. *The Scientific World Journal*, 2, 1-2. <https://doi.org/10.1155/2014/256919>
- Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., & Farah, I. O. (2013). Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: Assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4), 3339–3348. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2794-7>
- Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Daniels, J., Farah, I., & Bogatu, C. (2015). Evaluation of alpha and gamma aluminum oxide nanoparticle accumulation, toxicity, and depuration in *Artemia salina* larvae. *Environmental Toxicology*, 30(1), 109-118. <https://doi.org/10.1002/tox.21917>
- Barhoum, A., García, M., Rahier, H., & Van Assche, G. (2018). Chapter 9 Physicochemical characterization of nanomaterials: polymorph, composition, wettability, and thermal stability. *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures*, 1, 255-278. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51254-1.00009-9>
- Benavides, M., Fernández, J., Coelho, P., Lodeiro, C., & Diniz, M. (2016). Single and combined effects of aluminum (Al_2O_3) and zinc (ZnO) oxide nanoparticles in a freshwater fish, *Carassius auratus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 24578-24591. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-016-7915-3>
- Bhuvaneshwari, M., Thiagarajan, V., Nemade, P., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2018). Toxicity and trophic transfer of P25 TiO_2 NPs from *Dunaliella salina* to *Artemia salina*: effect of dietary and waterborne exposure. *Environmental Research*, 160, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.022>
- Bleta, R., Alphonse, P., Pin, L., Gressier, M., & Menu, M. (2012). An efficient route to aqueous phase synthesis of nanocrystalline $\gamma-Al_2O_3$ with high porosity: from stable boehmite colloids to large pore mesoporous alumina. *Journal of Colloid and Interface Science*, 367(1), 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.08.087>
- Bokov, D., Turki, A., Chupradit, S., Suksatan, W., Javed, M., Shewael, I., Kianfar, E. (2021). Nanomaterial by sol-gel method: synthesis and application. *Advances in Materials Science and Engineering*, 1(1), 1-21. <https://doi.org/10.1155/2021/5102014>
- Burklew CE, Ashlock J, Winfrey WB, Zhang B (2012) Efectos de las nanopartículas de óxido de aluminio en el crecimiento, desarrollo y expresión de microARN del tabaco (*Nicotiana tabacum*). *PLoS ONE* 7(5): e34783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034783>



- Brinker, J., & Scherer, G. (1990). *Sol-gel science. The Physics and Chemistry of sol-gel processing*. Academic Press.
- Campbell, B., & Miller, D. (2017). A method for evaluating insecticide efficacy against bed bug, *Cimex lectularius*, eggs and first instars. *Environment*, 121, 1-2. <https://app.jove.com/t/55092>
- Canli, E. (2021). Individual and combined effects of salinity and nanoparticles (Al_2O_3 , TiO_2) on the activity of antioxidant enzymes in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(8), 415-424. http://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_8_05
- Centro de Calidad Ambiental. (1995). *NMX-AA-110-1995-SCFI*. Centro de Calidad Ambiental.
- Chahardoli, A., Karimi, N., Ma, X., & Qalekhani, F. (2020). Effects of engineered aluminum and nickel oxide nanoparticles on the growth and antioxidant defense systems of *Nigella arvensis* L. *Scientific Reports*, 1, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60841-6>
- Chen, Y., Egan, G., Wan, J., Zhu, S., Jacob, R., Zhou, W., Hub, L. (2016). Ultra-fast self-assembly and stabilization of reactive nanoparticles in reduced graphene oxide films. *Nature Communications*, 7, 1-2. <https://doi.org/10.1038/ncomms12332>
- Cristino, A., Matias, I., Bastos, D., Dos Santos, R., Ribeiro, A., & Martins, L. (2020). Glycerol role in nano oxides synthesis and catalysis. *Catalysts*, 10(12), 1-2. <https://doi.org/10.3390/catal10121406>
- Cohen, J. (1988). Análisis de potencia estadística para las ciencias del comportamiento (2.^a ed.). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203771587>
- Coleman, J. G., Johnson, D. R., Stanley, J. K., Bednar, A. J., Weiss, C. A., Boyd, R. E., & Steevens, J. A. (2010). Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(7), 1575–1580. <https://doi.org/10.1002/etc.196>
- Damas, D., Nunes, R., & Carvalho, H. (2019). An improved acridine orange staining of DNA/RNA. *Acta Histochemica*, 121(4), 450-454. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.03.010>
- De Paiva, S., Medeiros, A., Miguel, T., Pireda, S., Almeida, P., Filho, A., & De Castro, E. (2023). Acute toxicity of titanium dioxide microparticles in *Artemia* sp. nauplii instar I and II. *Microscopy Research & Technique*, 86(6), 636-647. <https://doi.org/10.1002/jemt.24312>



- De, A., Chakrabarti, M., Ghosh, I., & Mukherjee, A. (2016). Evaluation of genotoxicity and oxidative stress of aluminium oxide nanoparticles and its bulk form in *Allium cepa*. *The Nucleus*, 59, 219-225. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13237-016-0179-y>
- Delgado, N. (2014). *Práctica evaluación de la eficacia de un insecticida biológico mediante análisis probit*. Universidad Central de Venezuela.
- Dhainaut, J., Deville, S., Amirouche, I., & Klotz, M. (2016). A reliable method for the preparation of multiporous alumina monoliths by ice- templating. *Inorganics*, 4(1),1-6. <https://doi.org/10.3390/inorganics4010006>
- Diez, M., Lahive, E., George, S., Schure, A., Van Gestel, C., Jurkschat, K., Spurgeon, D. (2015). Short-term soil bioassays may not reveal the full toxicity potential for nanomaterials; bioavailability and toxicity of silver ions ($AgNO_3$) and silver nanoparticles to earthworm *Eisenia fetida* in long-term aged soils. *Environmental Pollution*, 203, 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.033>
- Doskocz, N., Affek, K., & Zaleńska-Radziwill, M. (2017). Effects of aluminium oxide nanoparticles on bacterial growth. *Web of Conferences*, 17(19), 1-7. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20171700019>
- Drecun, O., Bernardini, C., Sarwar, M., & Striolo, A. (2023). Interactions between γ -alumina surfaces in water and aqueous salt solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 676, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.132152>
- Ejileugha, C., Ezejiolor, A., Ezealisiji, K., & Orisakwe, O. (2022). Metal oxide nanoparticles in oil drilling: aquatic toxicological concerns. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 7, 100-116. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100116>
- Feng, X., & Johnson, D. (2013). Characterization of dispersed and aggregated Al_2O_3 morphologies for predicting nanofluid thermal conductivities. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(1718), 1-2. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-013-1718-y>
- Food and Agriculture Organization [FAO]. (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO.
- Fuentes, J. (1987). *La crianza de la lombriz roja*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Gosteva, I., Morgalev, Y., Morgaleva, T., & Morgalev, S. (2015). Effect of Al_2O_3 and TiO_2 nanoparticles on aquatic organisms. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 98(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012007>



- Gouvea, D., & Murad, B. (2001). Influence of acid-basic characteristic of Al_2O_3 or SnO_2 surfaces on the stability of ceramic suspensions with commercial dispersants. *Cerâmica*, 47(301), 51-56. https://www.researchgate.net/publication/262752290_Influence_of_acid-basic_characteristic_of_Al2O3_or_SnO2_surfaces_on_the_stability_of_ceramic_suspensions_with_commercial_dispersants#full-text
- Grande, L., Vicente, M., Korili, S., & Gil, A. (2023). Synthesis strategies of alumina from aluminum saline slags. *Process Safety and Environmental Protection*, 172, 1010-1028. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.03.006>
- Harinisri, K., Jayanthi, N., & Kumar, S. (2023). Diverse application of green nanotechnology. A review. *Materials Today: Proceedings*, 1, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.06.085>
- Hassanpour, P., Panahi, Y., Ebrahimi-Kalan, A., Akbarzadeh, A., Davaran, S., Nasibova, A., Kavetsky, T. (2018). Biomedical applications of aluminium oxide nanoparticles. *Micro & Nano Letters*, 13(9), 1227-1366. <https://ietresearch.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1049/mnl.2018.5070>
- Hernández, J., Rincón, M., & Jiménez, R. (1997). Comportamiento de la lombriz roja (*Eisenia fetida*) bajo condiciones de clima cálido. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 14, 387-392. https://www.revfacagronluz.org.ve/v14_4/v144z001.html
- Hernández, M., & Acosta, L. (2021). Caracterización del dimorfismo sexual y reconocimiento de machos dimórficos en el complejo *Discocyrtus prospicius* (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae): una aproximación desde la morfometría geométrica. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 92, 1-12. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2021.92.3545>
- Hu, C., Li, M., Cui, Y., Li, D., Chen, J., & Yang, L. (2010). Toxicological effects of TiO_2 and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), 586-591. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.12.007>
- International Organization for Standardization [ISO]. (2008). *ISO 17512- 1:2008*. ISO.
- International Organization for Standardization [ISO]. (2017). *ISO/TS 20787:2017*. ISO.
- Jalili, P., Huet, S., Burel, A., Krause, B., Fontana, C., Chevance, S., Fessard, V. (2022). Genotoxic impact of aluminum-containing nanomaterials in human intestinal and hepatic cells. *Toxicology in Vitro*, 78, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105257>



- Jiang, W., Mashayekhi, H., & Xing, B. (2009). Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution*, 157(5), 1619-1625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.025>
- Kaboorani, A., & Riedl, B. (2012). Nano-aluminum oxide as a reinforcing material for thermoplastic adhesives. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(3), 1076-1081. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2011.12.001>
- Karmaoui, M., Silva, N., Amaral, V., Ibarra, A., Millán, Á., & Palacio, F. (2013). Synthesis of cobalt aluminate nanopigments by a non-aqueous sol-gel route. *Nanoscale* (10), 1-2. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/nr/c3nr34229h>
- Katiyar, P., Jin, C., & Narayan, R. (2005). Electrical properties of amorphous aluminum oxide thin films. *Acta Materialia*, 53(9), 2617-2622. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2005.02.027>
- Kim, D., Woo, S., & Yang, O. (2000). Effect of pH in a sol-gel synthesis on the physicochemical properties of Pd-alumina three-way catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, 26(4), 285-289. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00132-6](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00132-6)
- Kolesnyk, N., Simon, M., Marenkov, O., & Sharamok, T. (2018). Red Californian earthworm (*Eisenia foetida andrei*) as a valuable food item in fish farming (review). *Ribogospodars'ka nauka Ukraïni*, 4(46), 26-48. <http://dx.doi.org/10.15407/fsu2018.04.026>
- Krause, B., Kriegel, F., Rosenkranz, D., Dreiack, N., Tentschert, J., Jungnickel, H., Luch, A. (2020). Aluminum and aluminum oxide nanomaterials uptake after oral exposure. A comparative study. *Scientific Reports*, 10(2698), 1-2. <https://www.nature.com/articles/s41598-020-59710-z>
- Kucera, J. (2022). Chapter 10 - Reverse osmosis: fundamental causes of membrane deposition and approaches to mitigation. *Water-Formed Deposits*, 1, 215-237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822896-8.00010-8>
- Kumar, N., & Biswas, K. (2019). Cryomilling: an environment friendly approach of preparation large quantity ultra refined pure aluminium nanoparticles. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(1), 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2017.05.017>
- Lahive, E., Matzke, M., Svendsen, C., Spurgeon, D., Pourn, H., Zhang, H., Lofts, S. (2023). Soil properties influence the toxicity and availability of Zn from ZnO nanoparticles to earthworms. *Environmental Pollution*, 319, 1-10.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120907>

- Lamouri, S., Hamidouche, M., Bouaouadja, N., Belhouchet, H., Garnier, V., Fantozzi, G., & Trekat, J. (2017). Control of the γ -alumina to α -alumina phase transformation for an optimized alumina densification. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 56(2), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2016.10.001>
- Lewan, L., Andersson, M., & Morales, P. (1992). The use of *Artemia salina* in toxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, 20(2), 1-2. <https://doi.org/10.1177/026119299202000222>
- Libralato, G. (2014). The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Marine Environmental Research*, 101, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.08.002>
- Liu, C., Shih, K., Gao, Y., & Li, F. (2012). Dechlorinating transformation of propachlor through nucleophilic substitution by dithionite on the surface of alumina. *Journal of Soils and Sediments*, 12(5), 724-733. <http://dx.doi.org/10.1007/s11368-012-0506-0>
- Liu, H., Yang, R., Wang, Y., & Liu, S. (2013). Influence of alumina additions on the physical and chemical properties of lithium-iron-phosphate glasses. *Physics Procedia*, 48, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2013.07.004>
- Liu, D., Zhou, Y., Yang, Y., Zhang, L., & Jin, F. (2016). Characterization of high performance AIN nanoparticle-based transformer oil nanofluids. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 23(5), 2757-2767. <https://doi.org/10.1109/TDEI.2016.7736835>
- Loza, M., Choque, B., Pillco, H., Huayta, D., Chambi, I., & Cutili, B. (2010). Comportamiento de lombriz roja californiana y lombriz silvestre en bosta bovina y rumia bovina como sustrato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(4), 555-565. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v1n4/v1n4a8.pdf>
- Madhav, M., David, S., Suresh, R., Swathy, J., Bhuvaneshwari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2017). Toxicity and accumulation of Copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *Artemia salina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 52, 227-238. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.03.013>
- Magesan, P., Dhanalekshmi, K., & Jayamoorthy, K. (2024). Improved photocatalytic performance of chitosan blended - Al_2O_3 - TiO_2 and garlic loaded Al_2O_3 - TiO_2 hybrid nanocomposites. *Chemical Physics Impact*, 8, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2024.100535>



- Mahbubul, I., Saidur, R., Amalina, M., & Niza, M. (2016). Influence of ultrasonication duration on rheological properties of nanofluid: an experimental study with alumina-water nanofluid. *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 76, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.icheatmasstransfer.2016.05.014>
- María Molina-Salinas, G., & Luis Said-Fernández, S. (2006). A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). <https://www.researchgate.net/publication/231644204>
- Martínez, S., Rodríguez, J., Míguez, M., Soler, F., & Pérez, M. (2019). Desarrollo del ensayo de toxicidad estandarizado OECD N° 207 en lombriz de tierra expuesta al pesticida organofosforado Dimetoato. *Revista de Toxicología*, 36(2), 106-110. <https://www.redalyc.org/journal/919/91967023003/html/>
- McClain, M., Schlather, A., Ringe, E., King, N., Liu, L., Manjavacas, A., Halas, N. (2015). Aluminum nanocrystals. *Nano Letters*, 15(4), 2751- 2755. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b00614>
- Mehta, B., Subhedar, D., Panchal, H., & Sadasivuni, K. (2023). Stability and thermophysical properties enhancement of Al_2O_3 -water nanofluid using cationic CTAB surfactant. *International Journal of Thermofluids*, 20, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.ijft.2023.100410>
- Milani, S., Kakroudi, M., Vafa, N., Mokhayer, M., & Gharamaleki, S. (2020). Properties of alumina sol prepared via inorganic route. *Ceramics International*, 46(7), 9492-9497. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.12.210>
- Mohammadi, I., Afshar, A., & Ahmadi, S. (2016). Al_2O_3/Si_3N_4 nanocomposite coating on aluminum alloy by the anodizing route: fabrication, characterization, mechanical properties and electrochemical behavior. *Ceramics International*, 42(10), 12105-12114. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.04.142>
- Mohammed, A., Hussein, H., & Mohammed, M. (2017). The effect of crystallization time and acid type on the synthesis of nano-gamma alumina using double hydrothermal method. *Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering*, 18(2), 1-11. <https://ijcpe.uobaghdad.edu.iq/index.php/ijcpe/article/view/199/195>
- Mohammed, A., Khodair, Z., & Khadom, A. (2020). Preparation and investigation of the structural properties of α - Al_2O_3 nanoparticles using the sol-gel method. *Chemical Data Collections*, 29, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100531>



- Monteiro, M., Medina, L., Casanova, P., Espinola, M., Machado, A., Ribeiro, A., Quevedo, R. (2023). Evaluation of the acute toxicity by *Artemia salina* of hydroxyapatite nanoparticles obtained via sol-gel in an aqueous medium without using additives. *Ceramics International*, 49(23), 38509-38518. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.09.181>
- Nakagawa, S., & Cuthill, I. C. (2007). Effect size, confidence interval and statistical significance: A practical guide for biologists. In *Biological Reviews* (Vol. 82, Issue 4, pp. 591–605). <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00027.x>
- Nakayama, K., Tanabe, K., & Atwater, H. (2008). Plasmonic nanoparticle enhanced light absorption in GaAs solar cells. *Applied Physics Letters*, 93(12), 1-2. <https://doi.org/10.1063/1.2988288>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>
- Neuhauser, E., Loehr, R., Milligan, D., & Malecki, M. (1985). Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biology and Fertility of Soils*, 1, 149-152. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00301782>
- Nogueira, D., Pereira, V., Savoldi, O., Neves, M., Simioni, C., Ouriques, L., Matias, W. (2020). Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessment. *Environmental Research*, 182, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108987>
- Nyabadza, A., Vázquez, M., & Brabazon, D. (2023). Metalloid C–Mg, C and Mg nanoinks fabrication and colloidal stability studies. 26, 6205- 6219. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.09.024>
- Ocaranza-Joya, V. S., Manjarrez-Alcivar, I., Ruiz-González L. E., Guerrero-Galván, S. R., & Vega-Villasante, F. (2019). Sensitivity of different stages of *Artemia fransiscana* to potassium dichromate. *Pan- American Journal of Aquatic Sciences*, 14(1), 8-12. [http://panamjas.org/pdf_artigos/PANAMJAS_14\(1\)_8-12.pdf](http://panamjas.org/pdf_artigos/PANAMJAS_14(1)_8-12.pdf)
- Ogolo, N., & Onyekonwu, M. (2021). Effect of aluminum oxide nanoparticles on biotic factors of the environment. A review. *Arabian Journal of Chemical and Environmental Research*, 8(2), 247-258. <http://www.mocedes.org/ajcer/volume8/AJCER-16-Ogolo-2021.pdf>
- Ojok, W., Moodley, B., Wasswa, J., Ntambi, E., Wanasolo, W., & Bolender, J. (2023). Role of starch in one pot fabrication of mesoporous gamma- alumina with excellent fluoride sorption capacity. *Sustainable Chemistry for the Environment*, 3, 1-2.



<https://doi.org/10.1016/j.scenv.2023.100034>

Organization for Economic Cooperation and Development [OECD]. (1984). *OECD guidelines for testing of chemicals: earthworm acute toxicity test. OECD Guideline N° 207.*

Organization for Economic Cooperation and Development [OECD]. (1998). *Detailed review paper on aquatic testing methods for pesticides and industrial chemicals.* Organization for Economic Cooperation and Development [OECD]. (s.f.). *Assessment of chemicals.* OECD: <https://www.oecd.org/en/topics/assessment-of-chemicals.html>

Özkan, Y., Altinok, I., İlhan, H., & Sokmen, M. (2016). Determination of TiO_2 and $AgTiO_2$ Nanoparticles in *Artemia salina*: Toxicity, Morphological Changes, Uptake and Depuration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(1), 36–42. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1634-1>

Pakrashi, S., Dalai, S., Prathna, T., Trivedi, S., Myneni, R., Raichur, A., Mukherjee, A. (2013). Cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles towards fresh water algal isolate at low exposure concentrations. *Aquatic Toxicology*, 132-133, 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.018>

Piotrowska, Grazyna & Asztemborska, Monika & Giska, Iwona & Mikoszewski, A. (2012). Influence of Earthworms on Extractability of Metals from Soils Contaminated with Al_2O_3 , TiO_2 , Zn, and ZnO Nanoparticles and Microparticles of Al_2O_3 . *Polish Journal of Environmental Studies*. 21. 313-319. <https://www.pjoes.com/Influence-of-Earthworms-on-Extractability-of-Metals-from-Soils-Contaminated-with,88755,0,2.html>

Ramírez, M., Huirache, R., Espinosa, G., & Hernández, G. (2010). Estado del arte del proceso sol-gel en México. *Ciencia Ergo Sum*, 17(2), 183-188. <https://www.redalyc.org/pdf/104/10413200009.pdf>

Ramírez, P., & Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México.* Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Rojas, M. (2012). Diseño y síntesis de materiales "a medida" mediante el método sol-gel. UNED.

Romero, A., Lofts, S., Martín, F., & Van Gestel, C. (2017). Effects of aging and soil properties on zinc oxide nanoparticle availability and its ecotoxicological effects to the earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(1), 137-146. <https://doi.org/10.1002/etc.3512>



- Romero, R., Ruiz, V., Moncada, D., & Martínez, M. (2018). Effect of aluminum precursor on physicochemical properties of Al_2O_3 by hydrolysis/precipitation method. *Nova Scientia*, 10(20), 1-2. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i20.1217>
- Rutkowska, I., Marchewka, J., Jeleń, P., Odziomek, M., Korpyś, M., Paczkowska, J., & Sitarz, M. (2021). Chemical and structural characterization of amorphous and crystalline alumina obtained by alternative sol-gel preparation routes. *Materials*, 14(7), 1-2. <https://doi.org/10.3390/ma14071761>
- Rzayev, F., Gasimov, E., Agayeva, N., Manafov, A., Mamedov, C., Ahmadov, I., Choi, K. (2022). Microscopic characterization of bioaccumulated aluminium nanoparticles in simplified food chain of aquatic ecosystem. *Journal of King Saud University - Science*, 34(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101666>
- Sadiq, I. M., Pakrashi, S., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2011). Studies on toxicity of aluminum oxide (Al_2O_3) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3287–3299. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0243-0>
- Saleh, T., & Gupta, V. (2012). Synthesis and characterization of alumina nano-particles polyamide membrane with enhanced flux rejection performance. *Separation and Purification Technology*, 89(22), 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.01.039>
- Sathiyakumar, M., & Gnanam, F. D. (1999). Synthesis of sol-gel derived alumina powder: effect of milling and calcination temperatures on sintering behaviour. *British Ceramic Transactions*, 98(2), 87–92. <https://doi.org/10.1179/096797899680291>
- Samarasinghe, S., Krishnan, K., Aitken, R., Naidu, R., & Megharaj, M. (2023). Chronic effects of TiO_2 and ZnO nanoparticles to earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 5, 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2023.04.001>
- Serdar, O., Aydin, A., & Çiçek, I. (2024). Determination of oxidative stress responses caused by aluminum oxide ($\gamma-Al_2O_3$ and $\alpha-Al_2O_3$) nanoparticles in *Gammarus pulex*. *Chemosphere*, 352, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141193>
- Shahbazi, M. A., Hamidi, M., Mäkilä, E. M., Zhang, H., Almeida, P. v., Kaasalainen, M., Salonen, J. J., Hirvonen, J. T., & Santos, H. A. (2013). The mechanisms of surface chemistry effects of mesoporous silicon nanoparticles on immunotoxicity and biocompatibility. *Biomaterials*, 34(31), 7776–7789. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.052>



- Sharma, S., Das, P., & Sanfui, B. (2022). Unveiling the role of structure- property correlation and its validation towards engineering the application potential of sol-gel derived mesoporous gamma-alumina. *Molecular Systems Design & Engineering*, 7, 67-91. <https://doi.org/10.1039/D1ME00102G>
- Sifontes, Á., Gutiérrez, B., Mónaco, A., Yanez, A., Díaz, Y., Méndez, F., Brito, J. (2014). Preparation of functionalized porous nano- γ - Al_2O_3 powders employing colophony extract. *Biotechnology Reports*, 4, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.07.001>
- Sofronov, D., Lebedynskiy, O., Bezkrovnaya, O., Pritula, I., & Mateychenko, P. (2022). Mechanism of incorporation of oxide and aluminum oxyhydroxide into KDP crystalline matrix. *Journal of Crystal Growth*, 593(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2022.126765>
- Srikanth, K., Mahajan, A., Pereira, E., Costa, A., & Rao, J. (2015). Aluminium oxide nanoparticles induced morphological changes, cytotoxicity and oxidative stress in Chinook salmon (CHSE-214) cells. *Journal of Applied Toxicology*, 35(10), 1133-1140. <https://doi.org/10.1002/jat.3142>
- Stratakis, E., Barberoglou, M., Fotakis, C., Viau, G., Garcia, C., & Shafeev, G. (2009). Generation of Al nanoparticles via ablation of bulk Al in liquids with short laser pulses. *Optics Express*, 17(15), 12650-12659. <https://doi.org/10.1364/OE.17.012650>
- Sun, L., Fu, D., Chai, S., Yang, W., Zhou, K., & Li, W. (2020). Fractal characteristics and significances of the nanopores in oil shales during hydrous pyrolysis. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 10, 557-567. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13202-019-00785-4>
- Svartz, G., Papa, M., Gosatti, M., Jordán, M., Soldati, A., Samter, P., Guraya, M. M., Pérez Coll, C., & Perez Catán, S. (2017). Monitoring the ecotoxicity of γ - Al_2O_3 and Ni/ γ - Al_2O_3 nanomaterials by means of a battery of bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 200– 207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.029>
- Tafreshi, M., & Khanghah, Z. (2015). Infrared spectroscopy studies on sol- gel prepared alumina powders. *Materials Science*, 1, 1-2. <https://doi.org/10.5755/J01.MS.21.1.4872>
- Tapia-Salazar, M., Diaz-Sosa, V. R., & Cárdenas-Chávez, D. L. (2022). Toxicological effect and enzymatic disorder of non-studied emerging contaminants in *Artemia salina* model. *Toxicology Reports*, 9, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.01.007>
- Thiagarajan, V., Seenivasan, R., Jenkins, D., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2022). Mixture toxicity of TiO_2 NPs and tetracycline at two trophic levels in the marine



- ecosystem: *Chlorella* sp. and *Artemia salina*. *Science of The Total Environment*, 812, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152241>
- Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A., Olivier, J., Rodriguez, F., Rouquerol, J., & Sing, K. (2015). Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 1, 1-19. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>
- Van Truong, T., & Kim, D. (2022). Synthesis of high quality boehmite and γ -alumina for phosphorus removal from water works sludge by extraction and hydrothermal treatment. *Environmental Research*, 212, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113448>
- Wang, H., Wick, R. L., & Xing, B. (2009). Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al_2O_3 and TiO_2 to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 157(4), 1171–1177. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.004>
- Wang, X., Chen, C., & Wang, Y. (2022). Fractal analysis of porous alumina and its relationships with the pore structure and mechanical properties. *Fractal and Fractional*, 6(8), 1-2. <https://doi.org/10.3390/fractalfract6080460>
- Wang, Y., Cang, T., Zhao, X., Yu, Z., Chen, L., Wu, C., & Wang, Q. (2012). Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79(1), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.12.016>
- Wang, Z., Li, H., Tang, F., Ma, J., & Zhou, X. (2018). A facile approach for the preparation of nano-size zinc oxide in water/glycerol with extremely concentrated zinc sources. *Nanoscale Research Letters*, 13(202), 1-2. <https://link.springer.com/article/10.1186/s11671-018-2616-0>
- Weiss, M., Fan, J., Claudel, M., Sonntag, T., Didier, P., Ronzani, C., Lebeau, L., & Pons, F. (2021). Density of surface charge is a more predictive factor of the toxicity of cationic carbon nanoparticles than zeta potential. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00747-7>
- Wood, C., Wu, W., Yang, Y., Yang, J., Xi, Y., & Yang, W. (2023). Chapter Five - From ecology to oncology: To understand cancer stem cell dormancy, ask a Brine shrimp (*Artemia*). *Advances in Cancer Research*, 158, 199-231. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2022.12.004>
- Yao, N., Xiong, G., Zhang, Y., He, M., & Yang, W. (2001). Preparation of novel uniform mesoporous alumina catalysts by the sol-gel method. *Catalysis Today*, 68(1-3), 97-109. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00296-6](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00296-6)



- Yausheva, E. V., Sizova, E. A., Gavrish, I. A., Lebedev, S. V., & Kayumov, F. G. (2017). Effects of Al_2O_3 nano-particles on soil microbiocenosis, status of the antioxidant system and gut microflora of the red calyphorn worm (*Eisenia foetida*). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 52(1), 191-199. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.1.191rus>
- Yoldas, B. (1975). Alumina gels that form porous transparent Al_2O_3 . *Journal of Materials Science*, 10, 1856-1860. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00754473>
- Zhang, C., Lin, X., & Miao, Y. (2021a). The study of the biotoxicity effect of alumina nanoparticle on soil microbes. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 772, 1-6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/772/1/012094>
- Zhang, F., He, M., Zhang, C., Lin, D., & Zhang, J. (2021b). Combined toxic effects of dioxin-like PCB77 with Fe-based nanoparticles in earthworm *Eisenia foetida*. *Science of The Total Environment*, 766, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144347>
- Zheng, X., Li, Y., Chen, D., Zheng, A., & Que, Q. (2019). Study on analysis and sedimentation of alumina nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(510), 1-11. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16030510>



Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional

Título de Tesis:	Evaluación Ecotoxicológica de Nanopartículas de Al_2O_3 en dos modelos <i>in vivo</i>
Autora de la Tesis:	Erandy Gadiela Gallegos Martínez
ORCID:	https://orcid.org/0009-0001-8548-7203
Resumen de la Tesis:	<p>En este trabajo se sintetizaron NP de alúmina controlando su morfología y propiedades mediante, utilizando diferentes relaciones molares de alcóxido:agua (1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5) y glicerol como aditivo para optimizar sus propiedades y evaluar su efecto en la toxicidad de las NP. Se empleó tri-sec-butóxido de aluminio como precursor del metal y HNO_3 como catalizador de síntesis. Los polvos secos se calcinaron a 600 °C, 2°C/min durante 2 h y se caracterizaron con diferentes técnicas: infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (XRD), dispersión de luz electroforética (ELS), dispersión de luz dinámica (DLS), fisisorción de nitrógeno y microscopía electrónica de barrido (SEM). Los ensayos de toxicidad aguda se llevaron a cabo con los modelos biológicos <i>Artemia salina</i> y <i>Eisenia foetida</i> para evaluar la ecotoxicidad de las NP. Los tres nanomateriales (1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5) presentaron la fase cristalina gamma-alúmina, y los tamaños de cristalito calculados con la ecuación de Scherrer fueron de 57, 59 y 56 nm, mientras que el tamaño hidrodinámico en agua fue de 515, 1743 y 145 nm, respectivamente. El potencial zeta a pH 7, fue de +12.9 mV y + 9.24 mV para la síntesis 1:1.5 y 1:2.5 y -5.27 mV para la síntesis con la mayor proporción de agua (1:3.5). La modificación de las relaciones molares tuvo un efecto en las propiedades texturales del material y la mesoporosidad de la superficie. Los valores del área superficial específica, determinada mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (BET), fueron 266, 218 y 222 m²/g para las distintas muestras, mientras</p>



	<p>los tamaños promedio de poro oscilaron entre 5.6 y 7.9 nm. Para evaluar la toxicidad, se expusieron nauplios de <i>Artemia salina</i> durante 48 h a diferentes concentraciones de nanopartículas (125, 100, 75, 50 y 25 mg/L), junto con su respectivo control y dicromato de potasio como tóxico de referencia. La exposición a las diferentes nanopartículas mostró una baja toxicidad, con valores de CL_{50} muy cercanos entre sí de 185.85, 144.95 y 174.65 mg/L para las relaciones molares 1:1.5, 1:2.5 y 1:3.5, respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas entre ellas ($p > 0.05$), pero con diferencias significativas respecto al $K_2Cr_2O_7$, con un CL_{50} de 9.9 mg/L. Este bajo nivel de toxicidad fue confirmado mediante el marcador fluorescente naranja de acridina, donde se observó una fluorescencia verde opaca en los nauplios expuestos indicando el bajo daño celular. En contraste, los nauplios expuestos al $K_2Cr_2O_7$ mostraron una fluorescencia verde intensa, lo que confirma los severos daños celulares, probablemente causados por necrosis o apoptosis avanzada, lo que explica el alto número de nauplios muertos. Los ensayos con el modelo de <i>Eisenia foetida</i>, también confirma la baja toxicidad de las NP, ya que no se registraron muertes durante los 14 días de exposición a las diferentes concentraciones de las NP con respecto al tóxico cloroacetamida. El análisis de la pérdida de peso de las lombrices reveló que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$), entre la síntesis y las concentraciones, siendo la síntesis con mayor relación molar de agua 1:3.5 la que muestra un menor efecto en la pérdida de peso de las lombrices, lo que sugiere que las propiedades fisicoquímicas, específicamente la superficie específica, el volumen de poro, y el potencial zeta negativo, están directamente relacionadas con la baja toxicidad observada en <i>Eisenia foetida</i>.</p>
Palabras claves de la Tesis:	Nanopartículas de alúmina, Mesoporosidad, <i>Artemia salina</i> , <i>Eisenia foetida</i> , ecotoxicología, Sol-gel.
	AAT Bioquest. (s.f.). <i>LC50 Calculator</i> . AAT Bioquest: https://www.aatbio.com/tools/lc50-calculator Adam, P., Horváth, M., & Sinkó, K. (2023). Sol-gel derived porous aluminum oxide cryogel. Fiber composite systems. <i>Journal of Molecular Liquids</i> , 380, 1-2. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121755 Bhuvaneshwari, M., Thiagarajan, V., Nemade, P., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2018). Toxicity and trophic transfer of P25 TiO_2 NPs from <i>Dunaliella salina</i> to <i>Artemia salina</i> : effect of dietary and waterborne

**Referencias
citadas:**

- exposure. *Environmental Research*, 160, 39-46.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.022>
- Bleta, R., Alphonse, P., Pin, L., Gressier, M., & Menu, M. (2012). An efficient route to aqueous phase synthesis of nanocrystalline $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ with high porosity: from stable boehmite colloids to large pore mesoporous alumina. *Journal of Colloid and Interface Science*, 367(1), 120-128.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.08.087>
- Coleman, J. G., Johnson, D. R., Stanley, J. K., Bednar, A. J., Weiss, C. A., Boyd, R. E., & Steevens, J. A. (2010). Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(7), 1575–1580.
<https://doi.org/10.1002/etc.196>
- Liu, D., Zhou, Y., Yang, Y., Zhang, L., & Jin, F. (2016). Characterization of high performance AlN nanoparticle-based transformer oil nanofluids. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 23(5), 2757-2767.
<https://doi.org/10.1109/TDEI.2016.7736835>
- Magesan, P., Dhanalekshmi, K., & Jayamoorthy, K. (2024). Improved photocatalytic performance of chitosan blended - $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$ and garlic loaded $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$ hybrid nanocomposites. *Chemical Physics Impact*, 8, 1-2.
<https://doi.org/10.1016/j.chphi.2024.100535>
- McClain, M., Schlather, A., Ringe, E., King, N., Liu, L., Manjavacas, A., Halas, N. (2015). Aluminum nanocrystals. *Nano Letters*, 15(4), 2751- 2755.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b00614>
- Mehta, B., Subhedar, D., Panchal, H., & Sadasivuni, K. (2023). Stability and thermophysical properties enhancement of Al_2O_3 -water nanofluid using cationic CTAB surfactant. *International Journal of Thermofluids*, 20, 1-2.
<https://doi.org/10.1016/j.ijft.2023.100410>
- Monteiro, M., Medina, L., Casanova, P., Espinola, M., Machado, A., Ribeiro, A., Quevedo, R. (2023). Evaluation of the acute toxicity by *Artemia salina* of hydroxyapatite nanoparticles obtained via sol-gel in an aqueous medium without using additives. *Ceramics International*, 49(23), 38509-38518.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.09.181>
- Nakagawa, S., & Cuthill, I. C. (2007). Effect size, confidence interval and statistical significance: A practical guide for biologists. In *Biological Reviews* (Vol. 82, Issue 4, pp. 591–605). <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00027.x>
- Nogueira, D., Pereira, V., Savoldi, O., Neves, M., Simioni, C., Ouriques, L.,



- Matias, W. (2020). Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessment. *Environmental Research*, 182, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108987>
- Ogolo, N., & Onyekonwu, M. (2021). Effect of aluminum oxide nanoparticles on biotic factors of the environment. A review. *Arabian Journal of Chemical and Environmental Research*, 8(2), 247-258. <http://www.mocedes.org/ajcer/volume8/AJ CER-16-Ogolo-2021.pdf>
- Ojok, W., Moodley, B., Wasswa, J., Ntambi, E., Wanasolo, W., & Bolender, J. (2023). Role of starch in one pot fabrication of mesoporous gamma- alumina with excellent fluoride sorption capacity. *Sustainable Chemistry for the Environment*, 3, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.scenv.2023.100034>
- Ramírez, M., Huirache, R., Espinosa, G., & Hernández, G. (2010). Estado del arte del proceso sol-gel en México. *Ciencia Ergo Sum*, 17(2), 183-188. <https://www.redalyc.org/pdf/104/10413200009.pdf>
- Rutkowska, I., Marchewka, J., Jeleń, P., Odziomek, M., Korpyś, M., Paczkowska, J., & Sitarz, M. (2021). Chemical and structural characterization of amorphous and crystalline alumina obtained by alternative sol-gel preparation routes. *Materials*, 14(7), 1-2. <https://doi.org/10.3390/ma14071761>
- Rzayev, F., Gasimov, E., Agayeva, N., Manafov, A., Mamedov, C., Ahmadov, I., Choi, K. (2022). Microscopic characterization of bioaccumulated aluminium nanoparticles in simplified food chain of aquatic ecosystem. *Journal of King Saud University - Science*, 34(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101666>
- Sadiq, I. M., Pakrashi, S., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2011). Studies on toxicity of aluminum oxide (Al_2O_3) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3287–3299. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0243-0>
- Saleh, T., & Gupta, V. (2012). Synthesis and characterization of alumina nanoparticles polyamide membrane with enhanced flux rejection performance. *Separation and Purification Technology*, 89(22), 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.01.039>
- Sifontes, Á., Gutiérrez, B., Mónaco, A., Yanez, A., Díaz, Y., Méndez, F., Brito, J. (2014). Preparation of functionalized porous nano- γ - Al_2O_3 powders employing colophony extract. *Biotechnology Reports*, 4, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.07.001>
- Srikanth, K., Mahajan, A., Pereira, E., Costa, A., & Rao, J. (2015). Aluminium

oxide nanoparticles induced morphological changes, cytotoxicity and oxidative stress in Chinook salmon (CHSE-214) cells. *Journal of Applied Toxicology*, 35(10), 1133-1140. <https://doi.org/10.1002/jat.3142>

Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A., Olivier, J., Rodriguez, F., Rouquerol, J., & Sing, K. (2015). Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 1, 1-19. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>

Van Truong, T., & Kim, D. (2022). Synthesis of high quality boehmite and γ -alumina for phosphorus removal from water works sludge by extraction and hydrothermal treatment. *Environmental Research*, 212, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113448>

Wood, C., Wu, W., Yang, Y., Yang, J., Xi, Y., & Yang, W. (2023). Chapter Five - From ecology to oncology: To understand cancer stem cell dormancy, ask a Brine shrimp (*Artemia*). *Advances in Cancer Research*, 158, 199-231. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2022.12.004>

Yausheva, E. V., Sizova, E. A., Gavrish, I. A., Lebedev, S. V., & Kayumov, F. G. (2017). Effects of Al_2O_3 nano-particles on soil microbiocenosis, status of the antioxidant system and gut microflora of the red calyphorn worm (*Eisenia foetida*). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 52(1), 191-199. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.1.191rus>

Yoldas, B. (1975). Alumina gels that form porous transparent Al_2O_3 . *Journal of Materials Science*, 10, 1856-1860. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00754473>

Zhang, C., Lin, X., & Miao, Y. (2021a). The study of the biotoxicity effect of alumina nanoparticle on soil microbes. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 772, 1-6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/772/1/012094>

Zhang, F., He, M., Zhang, C., Lin, D., & Zhang, J. (2021b). Combined toxic effects of dioxin-like PCB77 with Fe-based nanoparticles in earthworm *Eisenia fetida*. *Science of The Total Environment*, 766, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144347>

Zheng, X., Li, Y., Chen, D., Zheng, A., & Que, Q. (2019). Study on analysis and sedimentation of alumina nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(510), 1-11. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16030510>